



Technische
Universität
Braunschweig

Assoziation von Metabolismus und Virulenz im pathogenen Darmbakterium *Clostridioides difficile*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Julia Danielle Hofmann
aus Achim

1. Referent: Professor Dr. Dietmar Schomburg
2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am: 12.12.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.02.2019

Druckjahr 2019

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Neumann-Schaal, M., Hofmann, J. D., Will, S. E. & Schomburg, D. (2015). Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630 Δ erm and concomitant fermentation product and toxin formation. BMC Microbiology 15: 281.

Riedel, T.* , Wetzels, D.* , Hofmann, J. D.*, Plorin, S. P. E. O., Dannheim, H., Berges, M., Zimmermann, O., Bunk, B., Schober, I., Spröer, C., Liesegang, H., Jahn, D., Overmann, J., Groß, U. & Neumann-Schaal, M. (2017). High metabolic versatility of different toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* isolates. International Journal of Medical Microbiology 307: 311–320 (* equally contributed).

Hofmann, J. D., Otto, A., Berges, M., Biedendieck, R., Michel, A.-M., Becher, D., Jahn, D. & Neumann-Schaal, M. (2018). Metabolic reprogramming of *Clostridioides difficile* during the stationary phase with the induction of toxin production. Frontiers in Microbiology 9: 1970.

Tagungsbeiträge

Hofmann, J. D., Neumann-Schaal, M. & Schomburg, D. (2015). Influence of medium composition on metabolism and toxin production of *Clostridium difficile* (Poster). 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics (Prokagenomics), Göttingen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	VII
Kurzfassung	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Clostridioides difficile</i>	1
1.2. Pathogenität und Toxine.....	2
1.3. Der Metabolismus.....	4
1.3.1. Stickland-Reaktionen.....	5
1.3.2. Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation.....	7
1.3.3. Zentralstoffwechsel und Buttersäuregärung	9
1.3.4. Wood-Ljungdahl-Weg.....	10
1.4. Systembiologie	10
1.5. Metabolomik	12
1.5.1. Metabolomanalyse	12
1.5.2. Probenvorbereitung und Derivatisierung.....	13
1.5.3. Gaschromatographie – Massenspektrometrie.....	13
1.5.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	15
1.6. Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Chemikalien	17
2.2. Software und Datenbanken.....	17
2.3. <i>Clostridioides difficile</i> Stämme	17
2.4. Medien und Lösungen	18
2.4.1. Brain-Heart-Infusion Medium (BHI)	18
2.4.2. Caseinhydrolysat-Medium.....	19
2.4.3. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).....	21

2.4.4.	Lösungen für die Metabolomanalyse.....	22
2.4.5.	Puffer und Lösungen für die CoA-Analytik.....	23
2.4.6.	Puffer und Lösungen für die Aminosäure-Analytik	23
2.5.	Mikrobiologische Techniken	24
2.5.1.	Zelldichte-Bestimmung.....	24
2.5.2.	Stammhaltung.....	24
2.5.3.	Kultivierungsbedingungen.....	25
2.5.4.	Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ	25
2.6.	Probenahme	26
2.6.1.	Probenahme für die GC-MS.....	26
2.6.2.	Probenahme für die CoA-Analyse	26
2.6.3.	Probenahme für die Transkriptomanalyse.....	26
2.6.4.	Probenahme für die Proteomanalyse.....	26
2.7.	Aufarbeitung für die GC-MS Analyse	27
2.7.1.	Extraktion der intrazellulären Metabolite	27
2.7.2.	Präparation des Überstands	27
2.7.3.	Extraktion flüchtiger Metabolite aus dem Überstand.....	27
2.7.4.	Derivatisierung	28
2.8.	Gaschromatographie – Massenspektrometrie	28
2.8.1.	Leco Pegasus 4D GC x GC TOF Massenspektrometer.....	28
2.8.2.	DSQ II GC Quadrupol Massenspektrometer	29
2.8.3.	Prozessierung der GC-MS Daten.....	29
2.9.	Analyse von Coenzym A-Derivaten	31
2.9.1.	Extraktion von Coenzym A-Derivaten	31
2.9.2.	Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie	31
2.9.3.	Prozessierung der LC-MS Daten.....	32
2.10.	Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC-FLD	32

2.10.1.	Probenvorbereitung	32
2.10.2.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – Fluoreszenzdetektor.....	32
2.11.	Probenahme und ELISA zur Toxinquantifizierung	33
2.12.	Probenahme und ATP-Bestimmung mittels Enzmykit.....	34
2.13.	Probenahme und NAD ⁺ /NADH-Bestimmung mittels kolorimetrischem Test	35
2.14.	Transkriptomanalyse	35
2.15.	Proteomanalyse.....	36
2.16.	Statistische Datenanalyse und Visualisierung	36
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	37
3.1.	Screening auf Nährstoffe, die die Toxin A-Produktion in <i>C. difficile</i> 630 Δ erm beeinflussen.....	37
3.1.1.	Wachstumsverhalten von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm mit verschiedenen Substraten	38
3.1.2.	Auswirkungen der verschiedenen Substrate auf die Toxinproduktion von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm	42
3.2.	Analyse des Einflusses verschiedener Substrate auf den Stoffwechsel und die Toxinproduktion	46
3.2.1.	Glucosekonzentration beeinflusst die Toxinproduktion gegensätzlich in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium	46
3.2.2.	L-Lactat reduziert Toxinproduktion	58
3.2.3.	Mannose zeigt Einfluss auf die Zellaggregation	65
3.3.	Zeitaufgelöste Analyse der Virulenz-assoziierten Stoffwechselanpassungen in CDMM.....	70
3.3.1.	Untersuchung der Stoffwechselanpassungen im CDMM	70
3.4.	Einfluss des Cysteins auf den Virulenz-assoziierten Stoffwechsel	78
3.4.1.	Änderungen in der Aminosäure- und Glucoseaufnahme.....	80
3.4.2.	Änderungen im Stoffwechsel von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm kultiviert ohne Cystein und Zusammenhang zur Toxinproduktion.....	82

3.4.3. Änderungen im Stoffwechsel von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> kultiviert mit 2 g/L Cystein und Zusammenhang zur Toxinproduktion.....	84
3.5. Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und Stoffwechsel in verschiedenen <i>C. difficile</i> Isolaten	88
3.5.1. Wachstum und Toxinbildung der verschiedenen <i>C. difficile</i> Stämme	89
3.5.2. Fermentationsprofile der verschiedenen <i>C. difficile</i> Stämme.....	92
4. Zusammenfassung.....	96
5. Literaturverzeichnis.....	99
6. Anhang.....	115
6.1. Übersicht digitaler Anhänge	115
Danksagung.....	117

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ABC-Transporter	Membranprotein mit ATP-bindender Kasette
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of variance</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
Bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic local alignment search-Tool</i>
BTM	Biotrockenmasse
CDI	<i>Clostridium difficile</i> -Infektion
CoA	Coenzyme A
Cys	Cystein
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland)
EC	<i>Enzyme Commission numbers</i>
EI	Elektronenionisation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	Latein: <i>et alii</i> , und andere
eV	Elektronenvolt
FC	Fold Change
FLD	Fluoreszenzdetektor
FMOC	Fluorenylmethylchloroformat
GC	Gaschromatographie
Glu	Glucose
H ₂ O / ddH ₂ O	Wasser / doppelt destiliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Lac	L-Lactat
LC	Flüssigchromatographie

Abkürzung	Erklärung
Kb	Kilobasen
kDa	kiloDalton
$[M+H]^+ / [M+H]^-$	Molekülion $\pm H^+$
MRSA	Multiresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometer
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoro-acetamide
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert/reduziert)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat (oxidiert/reduziert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD _{max}	Maximale optische Dichte
OPA	O-phthaldehyd
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PTS	Phosphotransferase-System
PTV	Temperaturprogrammierte Verdampfung
RI	Retentionsindex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
SPE	Festphasenextraktion
TMS	Trimethylsilyl
TOF	<i>Time of Flight</i>

Die Einheiten wurden nach dem internationalen Einheitensystem (SI) abgekürzt. Eine Ausnahme bilden die molaren Konzentrationen (mol/L), die mit dem Großbuchstaben M abgekürzt sind. Weiterhin wurden chemische Elemente gemäß ihren Symbolen im Periodensystem der Elemente abgekürzt.

Abstract

In the last few years the human pathogen *Clostridioides difficile* has developed to one of the most common causes of nosocomial and antibiotic-associated intestinal infections with symptoms vary from mild diarrhoea to pseudomembranous colitis. The major virulence factors are the toxins A and B. In this thesis, the relationship between toxin production and metabolism was investigated in order to uncover which adaptation strategies to an altered nutrient supply influence toxin production.

Supplementation with cysteine and L-lactate led to a reduced toxin secretion of *C. difficile* 630 Δ erm. By supplementation with cysteine, the toxin production was reduced by a severe iron limitation due to formed hydrogen sulphide during cysteine degradation, resulting in insoluble iron sulphide. This led to a reduced activity of many metabolic pathways in which iron is used as ferredoxin for the transfer of electrons. The carbon flow was re-directed into lactic acid fermentation and high amounts of L-lactate were secreted. In contrast, external supplementation with L-lactate led to an uptake of lactate. By electron bifurcation, the lactate is converted to pyruvate, which greatly reduced the NAD⁺/NADH ratio. Due to similar intracellular toxin concentrations, conformational changes in the holin TcdE, caused by the altered redox potential, were suggested as the reason for the reduced extracellular toxin concentration.

Various glucose concentrations also caused changes in the metabolism led to an altered NAD⁺/NADH ratio. High glucose concentrations resulted in reduced extracellular toxin concentrations due to carbon catabolite repression in the metabolism. A moderate glucose concentration increased toxin production compared to glucose-free cultures. This was probably due to a higher conversion of amino acids and a reduced NAD⁺/NADH ratio. The addition of mannose led to strongly increased extracellular toxin concentrations compared to cultivation with glucose. This can be attributed to metabolic differences between planktonic cells and biofilms as the cells grown with mannose did not show cell aggregation in the stationary phase as was demonstrated for cells grown with glucose. The dependence of toxin production on cell aggregation and lactate concentration could also be transferred to other isolates of *C. difficile*.

The results of this work extend the understanding of the relationships between metabolism and toxin production in *C. difficile* and therefore offer approaches for the investigation of new therapeutic strategies.

Kurzfassung

Der humanpathogene Krankenhauskeim *Clostridioides difficile* hat sich in den letzten Jahren zu einem der häufigsten Erreger nosokomialer und Antibiotika-assoziiierter Darmerkrankungen entwickelt. Die Symptome variieren von leichtem Durchfall bis hin zu pseudomembranöser Kolitis. Nach heutigen Kenntnissen beruht die Infektion auf den Hauptvirulenzfaktoren Toxin A und B. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Toxinproduktion und dem Metabolismus untersucht, um aufzudecken, welche Adaptionsstrategien auf ein verändertes Nährstoffangebot die Toxinproduktion beeinflussen.

Die Supplementierung mit Cystein und L-Lactat führte bei *C. difficile* 630 Δ *erm* zu einer reduzierten extrazellulären Toxinkonzentration. Bei der Umsetzung von Cystein wird Schwefelwasserstoff gebildet, wodurch unlösliches Eisensulfid ausfällt. Dies führte zu einem Eisenmangel. Da Eisen in Form von Ferredoxin nicht für die Übertragung von Elektronen zur Verfügung stand, wurden viele der Stoffwechselwege stark reduziert. Im Zentralstoffwechsel wurde die Reaktion der Milchsäuregärung erhöht und es wurden große Mengen L-Lactat sekretiert. Im Gegensatz dazu kam es bei einer Supplementierung mit L-Lactat zu einer Aufnahme des Lactats. Das Lactat wurde über eine über Elektronen-Bifurkation laufende Lactatdehydrogenase zu Pyruvat umgesetzt, wodurch das NAD⁺/NADH-Verhältnis stark reduziert wurde. Da die Toxine intrazellulär ähnliche Konzentrationen zeigten, könnte die Reduktion der extrazellulären Toxinkonzentration durch eine aus dem veränderten Redoxpotential resultierenden Konformationsänderung des Holins TcdE zustande kommen.

Verschiedene Glucosekonzentrationen bewirkten Änderungen im Stoffwechsel, die zu einem veränderten NAD⁺/NADH-Verhältnis führten. Hohe Glucosekonzentrationen führten aufgrund einer Kohlenstoff-Katabolitrepression im Stoffwechsel zu reduzierten extrazellulären Toxinkonzentrationen. Eine moderate Glucosekonzentration erhöhte die Toxinproduktion im Vergleich zu Glucose-freien Kultivierungen. Dies beruhte vermutlich auf einer höheren Umsetzung von Aminosäuren und einem dadurch reduzierten NAD⁺/NADH-Verhältnis. Die Zugabe von Mannose führte zu stark erhöhten extrazellulären Toxinkonzentrationen im Vergleich zu Kultivierungen mit Glucose. Kultivierungen mit Mannose zeigten keine, für Kultivierungen mit Glucose nachgewiesene, Zellaggregation in der stationären Phase. Auf diese kann der Unterschied im sekretierten Toxin zurückgeführt werden. Die Abhängigkeit der

Toxinproduktion von der Zellaggregation und von der Lactatkonzentration konnten auch auf weitere Isolate von *C. difficile* übertragen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Verständnis der Zusammenhänge zwischen Stoffwechsel und Toxinproduktion in *C. difficile* und bieten daher Ansätze für die Erforschung neuer therapeutischer Strategien.

1. Einleitung

1.1. *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile wurde in den späten 1970ern als schwerer Krankheitserreger anerkannt (Bartlett et al., 1978). Die Symptome einer Infektion mit diesem Erreger (CDI: *C. difficile*-Infektion) variieren zwischen leichtem Durchfall bis hin zu pseudomembranöser Kolitis und toxischem Megacolon (Kelly und Lamont, 1998). Risikofaktoren sind eine Antibiotikatherapie, Krankenhausaufenthalte, ein hohes Alter oder eine Immunsuppression (Kelly et al., 1994). In den letzten Jahren stieg auch die Zahl bekannter Fälle der ambulant erworbenen Infektionen bei gesunden Erwachsenen (Khanna et al., 2012). Vor einigen Jahren wurde CDI als die am häufigsten im Krankenhaus erworbene Infektion ermittelt, und löste damit die Infektion mit multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ab (Miller et al., 2011). In Deutschland lag die Zahl der Fälle von CDI 2012 bei mindestens 83 pro 100.000 Einwohner. Die Mortalität lag im Jahr nach der Diagnose bei 13,5 % mit CDI als Erstdiagnose (Stausberg, 2015; Lübbert et al., 2016). In den USA liegt die Infektionszahl sogar bei 453.000 und die Zahl der Toten beträgt ca. 29.000 pro Jahr (Lessa et al., 2015).

Das der Klasse der Clostridia zugehörige Bakterium *C. difficile* ist ein obligat anaerobes, grampositives, motiles, stäbchenförmiges Bakterium. 1935 wurde es erstmals aus Neugeborenen isoliert und aufgrund von Kultivierungsschwierigkeiten als *Bacillus difficilis* beschrieben (HALL und O'Toole, 1935). Nach Umbenennungen zu *Clostridium difficile* (Sneath et al., 1980) und *Peptoclostridium difficile* (Yutin und Galperin, 2013) wurde es 2016 der neu erstellten Gattung *Clostridioides* zugeordnet (Lawson et al., 2016; Oren and Garrity, 2016).

C. difficile produziert Endosporen, wodurch ein Überleben auch bei feindlichen oder ungünstigen Umweltbedingungen möglich ist. In Form der Sporen ist die Resistenz gegen Desinfektionsmittel, Sauerstoff und Hitze erhöht (Wilcox und Fawley, 2000; Jump et al., 2007; Ali et al., 2011; Rodriguez-Palacios und Lejeune, 2011). Das Bakterium gelangt als Endospore über eine fäkal-orale Übertragung in den menschlichen Organismus. Die Sporen überleben den sauren pH des Magens und keimen, gefördert durch primäre Gallensäuren, im Dünndarm aus (Sorg und Sonenshein, 2008; Giel et al., 2010). Eine Antibiotika-induzierte Dysbiose der Darmmikrobiota fördert dessen Besiedelung (Kelly et al., 1994; Sebaihia et al., 2006) und eine Infektion mit *C. difficile*.

Zum derzeitigen Stand wird die Population der *C. difficile* Stämme in acht verschiedene monophyletische Gruppen (Kladen) unterteilt. Hierbei werden die Kladen 1 – 5, sowie C-I (Dingle et al., 2014), C-II und C-III (Janezic et al., 2016) unterschieden. In den meisten Kladen befinden sich sowohl toxische als auch nicht-toxische Stämme, nur in den Kladen 2 und 3 befinden sich ausschließlich toxische Stämme (Dingle et al., 2014; Knight et al., 2015). Die Kladen C-I, C-II und C-III dagegen beinhalten hauptsächlich nicht-toxische Stämme (Dingle et al., 2014; Janezic et al., 2016).

Die meistuntersuchten Stämme sind der hypervirulente Stamm R20291, der Modellstamm 630 oder die entsprechende Erythromycin-sensitive Variante 630 Δ *erm*, die von Hussain et al. (2005) durch spontane Mutation erzeugt wurde. Beide Stämme wurden ursprünglich aus Patienten mit CDI isoliert (Wüst et al., 1982; Warny et al., 2005).

1.2. Pathogenität und Toxine

Mehrere Virulenzfaktoren von *C. difficile* tragen zur Adhärenz und Kolonisation bei, jedoch korrelieren die Symptome der CDI mit der Produktion der Hauptvirulenzfaktoren Toxin A (TcdA) und B (TcdB) (Awad et al., 2014). Einige, vor allem hypervirulente Stämme, produzieren ein drittes binäres Toxin (Gerding et al., 2014), dessen Rolle im Infektionsprozess derzeit diskutiert wird (Martin-Verstraete et al., 2016). TcdA und TcdB sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 308 kDa und 270 kDa. Die Gene *tcdA* und *tcdB*, die für die Toxine codieren, sind in einer chromosomalen Region über 19,6 kb lokalisiert, dem sogenannten Pathogenitätslocus (PaLoc) (Hammond und Johnson, 1995; Braun et al., 1996; Hundsberger et al., 1997; Abb. 1).

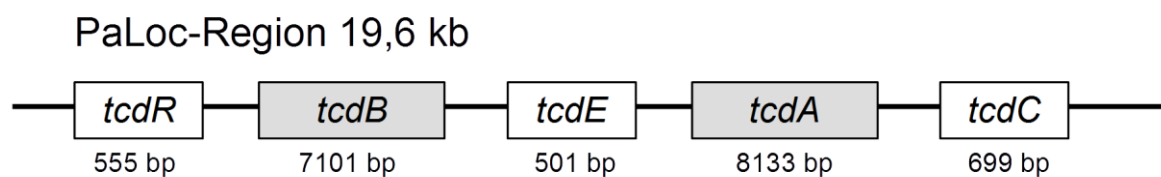


Abb. 1: Schematische Darstellung der PaLoc-Region mit den Genen *tcdR*, *tcdB*, *tcdE*, *tcdA* und *tcdC*. Unter jedem Gen ist die Anzahl der Basenpaare (bp) angegeben, angepasst aus (Di Bella et al., 2016).

Der PaLoc zeigt einige Charakteristika eines mobilen genetischen Elements, scheint intrinsisch jedoch nicht mobil zu sein und befindet sich in allen toxischen Stämmen an der gleichen Stelle im Genom. In nicht-toxischen Stämmen ist der PaLoc durch eine hochkonservierte 115/75 bp nicht codierende Region ersetzt (Braun et al., 1996; Dingle et al., 2014). Der PaLoc kann an verschiedenen, auch von der klassischen PaLoc-

Integrationsstelle entfernten, Positionen im Genom integriert werden und auch ein Transfer in nicht-toxigene Stämme ist möglich. Dies deutet darauf hin, dass der PaLoc durch horizontalen Gentransfer erworben wurde (Braun et al., 1996; Brouwer et al., 2013).

Zusätzlich zu den Toxingenen sind in den meisten pathogenen Stämmen die drei Gene *tcdR*, *tcdC* und *tcdE* im PaLoc lokalisiert (Bouillaut et al., 2015; Monot et al., 2015; Smits et al., 2016).

Das Gen *tcdR* codiert für ein kleines Protein (22 kDa) mit einem C-terminalen DNA-Bindungsmotiv (Mani und Dupuy, 2001). TcdR wird für die Einleitung der Transkription der Toxingene als Sigma-Faktor der RNA-Polymerase benötigt. TcdR bindet nicht allein an die Toxin-Promotor-Regionen, sondern leitet das Kernenzym der RNA-Polymerase so, dass es die Promotoren spezifisch erkennt und die Toxingene transkribiert (Mani et al., 2002). Darüber hinaus aktiviert TcdR auch seine eigene Expression, was zu dem Vorhandensein von zwei potenziellen Promotoren für die TcdR-anhängige Transkription in der Region aufwärts des *tcdR*-Gens passt (Mani et al., 2002).

TcdC zeigt keine Ähnlichkeiten zu bekannten Regulatorproteinen und besitzt auch kein DNA-Bindungsmotiv (Dupuy et al., 2008). Es ist ein saures, membranassoziiertes Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 26 kDa (Govind et al., 2006; Matamouros et al., 2007). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass TcdC als Anti-sigma Faktor fungiert und die Toxingenexpression negativ reguliert (Matamouros et al., 2007; Carter et al., 2011). Jedoch haben Versuche mit dem in dieser Arbeit verwendeten Modellstamm *C. difficile* 630 Δ *erm* gezeigt, dass ein defektes *tcdC*-Gen nur geringe bis keine Auswirkungen auf die Toxinproduktion unter den getesteten Bedingungen hat (Bakker et al., 2012; Cartman et al., 2012).

TcdE ist ein Holin-ähnliches Protein, das für die effektive Sekretion der Toxine A und B benötigt wird (Tan et al., 2001b; Govind und Dupuy, 2012; Olling et al., 2012; Govind et al., 2015). Holine sind Proteine von Bacteriophagen, die an der Lyse der Zellen und am Entlassen von pyrogenen Phagen aus den Wirtszellen involviert sind (Young und Bläsi, 1995). In *C. difficile* wurden drei Isoformen von TcdE nachgewiesen. Die lange Isoform ist an der Sekretion der Toxine beteiligt, während die kurze Isoform die Lyse der Zellen induziert (Mehner-Breitfeld et al., 2018).

TcdA und TcdB teilen eine gemeinsame Domänenstruktur mit 44 % Sequenzidentität und etwa 66 % Sequenzähnlichkeit, wobei die meisten Unterschiede in der Sequenz der C-terminalen Bindungsdomäne zu finden sind. Beide Proteine weisen die gleiche multi-

modulare Domänenstruktur auf, die als ABCD-Modell bezeichnet wird (Jank und Aktories, 2008; Abb. 2).



Abb. 2: Schematische Darstellung der multi-modularen Domänenstruktur der Toxine A und B als ABCD-Modell. N/C: N- und C-terminales Ende; GTD: Glucosyltransferase-Domäne; CPD: Cystein-Protease-Domäne.

Die Region A befindet sich am N-Terminus und enthält die 63 kDa Glucosyltransferase-Domäne, die auf die kleinen Guanosintriphosphatasen (GTPasen) wirkt und damit Funktionen der Wirtszelle stört. Region B, die sich am C-terminalen Ende befindet, ist an der Rezeptorbindung beteiligt und besteht aus kombinierten wiederholten Oligopeptiden, die die Rezeptorbindungsdomäne bilden. Die Region C entspricht der Cystein-Protease-Domäne, die die autokatalytische Spaltung der Toxine fördert. Die Region D ist an der Translokation der Toxine in das Cytosol sowie deren Bindung an die Zielzellen beteiligt (Jank und Aktories, 2008). Durch die Glycosylierung der Rho- und Ras- GTPasen in den Wirtszellen wird die Regulation des Zytoskeletts gestört, was zum Zelltod und einer starken Entzündungsreaktion führt (Just et al., 1995; Pruitt und Lacy, 2012; Chandrasekaran und Lacy, 2017).

Eine Möglichkeit, die Toxinproduktion zu beeinflussen, sind veränderte Umgebungsbedingungen. Die wichtigsten Einflussfaktoren ergeben sich dabei aus der Nährstoffsituation (Martin-Verstraete et al., 2016). So erhöhen beispielsweise begrenzte Konzentrationen von Biotin oder hohe Konzentrationen von kurzkettigen Säuren die Toxinproduktion, während bestimmte Mischungen von Aminosäuren oder auch einzelne Aminosäuren wie Cystein die Toxinproduktion stark reduzieren können (Yamakawa et al., 1996; Dupuy und Sonenshein, 1998; Karlsson et al., 1999; Karlsson et al., 2008; Dubois et al., 2016). Zudem zeigen auch die Kultivierungstemperatur und der Einsatz von Antibiotika Auswirkungen auf die Toxinproduktion (Onderdonk et al., 1979; Honda et al., 1983; Barc et al., 1992; Karlsson et al., 2003).

1.3. Der Metabolismus

C. difficile ist ein obligat anaerobes Bakterium, es besitzt daher keine Atmungskette, über die in aeroben Bakterien ein Protonengradient über die Membran gebildet wird, der die Energie für die ATP-Synthase erzeugt (Steigmiller et al., 2008). Für die ATP Generierung

in *C. difficile* über ATP-Synthasen werden ebenfalls Ionengradienten genutzt, diese werden durch den Rnf-Komplex aufgebaut. Eine weitere Form der Energiegewinnung ist die Substratkettenphosphorylierung, die in der Glykolyse, in Fermentationsprozessen des Zentralstoffwechsels und den vor allem aus Clostridien bekannten Stickland-Reaktionen erfolgt. In diesen Stoffwechselwegen werden die Substrate nicht vollständig zu CO₂ abgebaut, sondern zu organischen Säuren umgesetzt, die sekretiert werden (Elsden et al., 1976; Elsden und Hilton, 1978; Neumann-Schaal et al., 2015; Abb. 3).

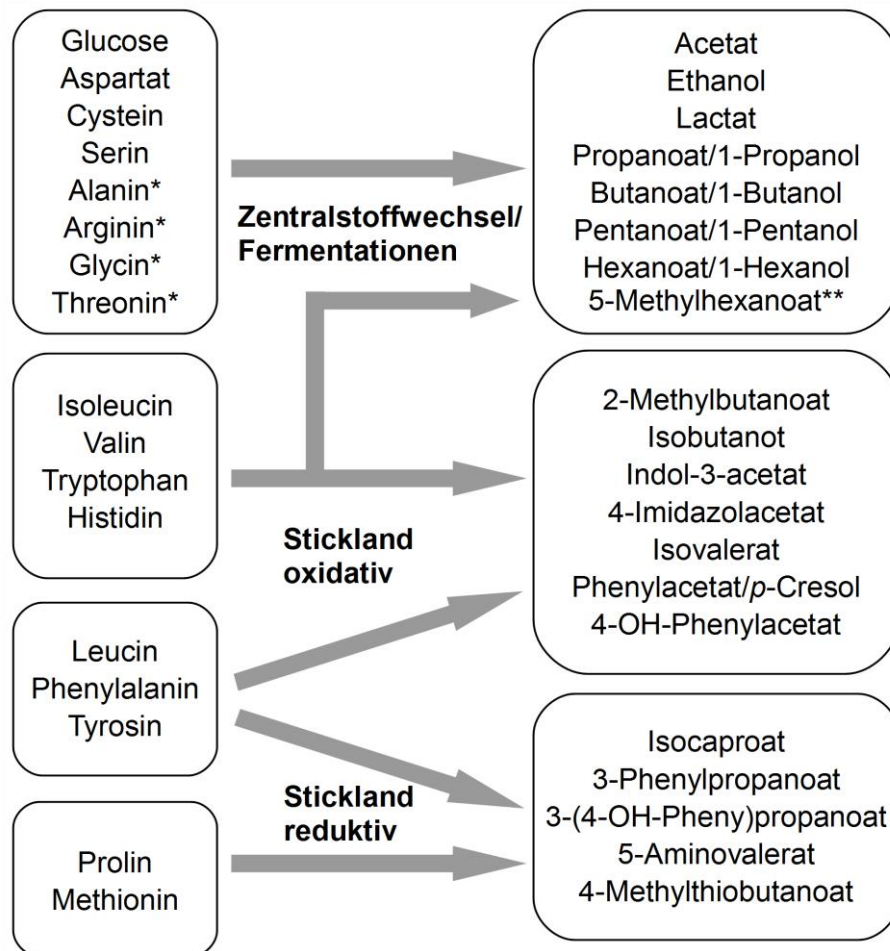


Abb. 3: Übersicht über Edukte und Produkte der oxidativen und reduktiven Stickland-Reaktionen und des Zentralstoffwechsels mit Glucose als repräsentativem Zucker. * Stickland-Reaktion zu Acetyl-CoA oder Propanoyl-CoA, anschließende Umsetzung im Zentralstoffwechsel; ** Umsetzung von Isovaleryl-CoA aus Stickland-Reaktion im Zentralstoffwechsel, angelehnt an (Riedel et al., 2017).

1.3.1. Stickland-Reaktionen

Die Stickland-Reaktionen beschreiben eine gekoppelte Fermentation von Aminosäuren durch die Oxidation und Reduktion zu den entsprechenden organischen Säuren (Stickland, 1934; Nisman, 1954). Die als Elektronendonator fungierende Aminosäure wird

zu einer Carbonsäure oxidiert, die ein Kohlenstoff-Atom kürzer ist als die entsprechende Aminosäure. Die als Elektronenakzeptor fungierende Aminosäure wird zu einer Carbonsäure mit derselben Kettenlänge wie die entsprechende Aminosäure reduziert (Abb. 4). Bestimmte Aminosäuren, z.B. Leucin und Phenylalanin, können sowohl als Elektronendonator als auch als Elektronenakzeptor reagieren (Elsden et al., 1976; Elsden und Hilton, 1978, 1979; Neumann-Schaal et al., 2015; Dannheim et al., 2017b; Riedel et al., 2017). In den Umsetzungen einiger Aminosäuren, z.B. Prolin und Glycin, sind modifizierte Reaktionswege zu finden (Turner und Stadtman, 1973; Kabisch et al., 1999; Jackson et al., 2006).

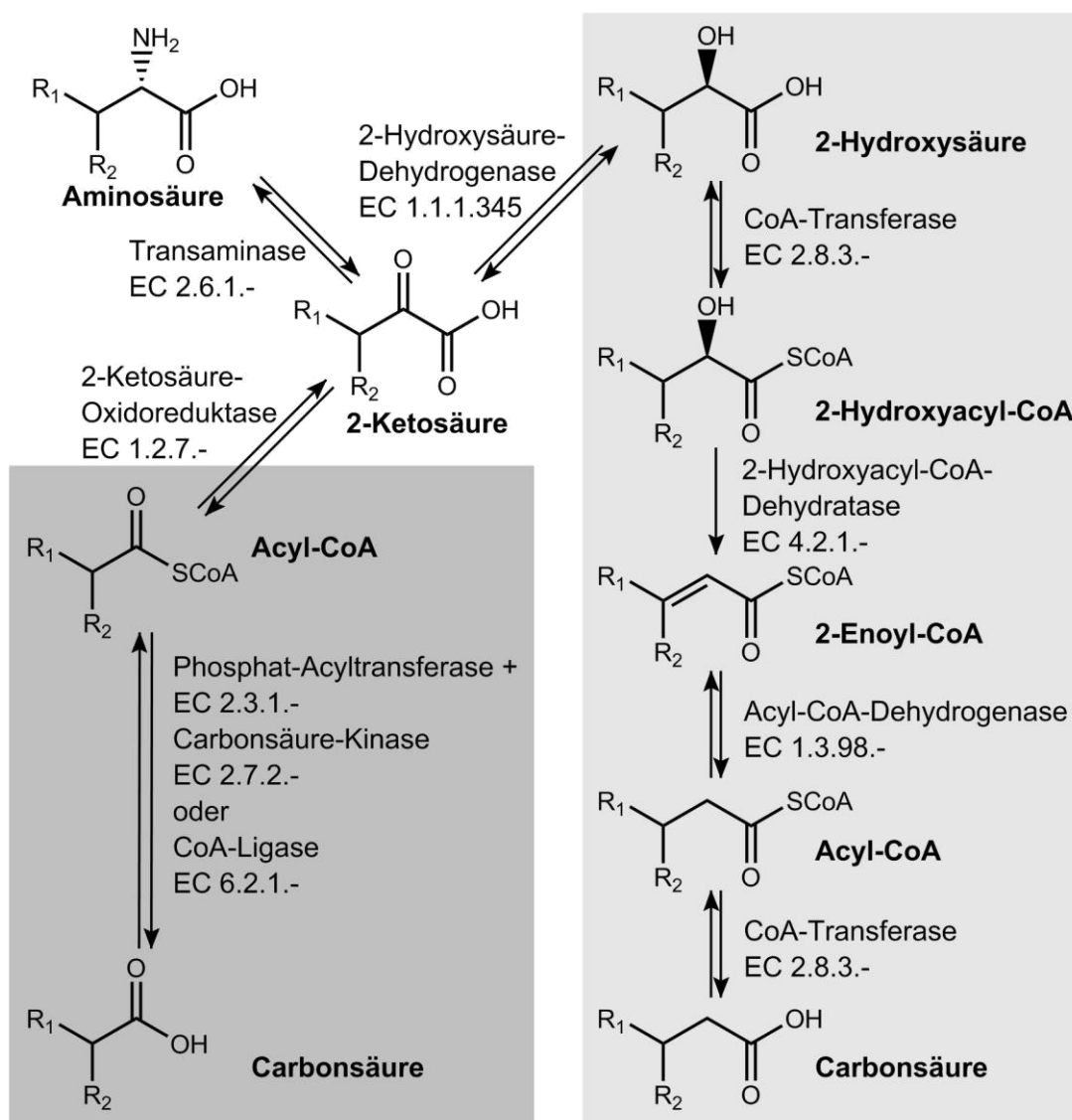


Abb. 4: Schematischer Reaktionsverlauf der oxidativen und reduktiven Stickland-Reaktionen. Dunkelgrau: oxidative Stickland-Reaktion, hellgrau: reduktive Stickland-Reaktion, R: Alkylrest, angepasst aus (Neumann-Schaal et al., 2015).

Sowohl in den oxidativen als auch den reduktiven Stickland-Reaktionen wird im ersten Schritt die Aminogruppe transaminiert, wodurch die entsprechende 2-Ketosäure entsteht. Dabei wird durch die Regeneration von 2-Oxoglutarat ein NADH produziert (O'Neil und DeMoss, 1968; Barker, 1981). Die Aminosäuren Threonin und Methionin können auch über Lyasen deaminiert werden (Hofmeister et al., 1993; Morozova et al., 2013).

Im oxidativen Weg wird im zweiten Schritt das entsprechende Acyl-CoA gebildet und ein CO₂ abgespalten. Bei dieser Reaktion fungiert Ferredoxin als Elektronenakzeptor (Mai and Adams, 1994; Heider et al., 1996). Im letzten Schritt wird das Coenzym A (CoA) abgespalten und die Carbonsäure über eine CoA-Ligase oder ein phosphoryliertes Zwischenprodukt gebildet, dabei wird parallel ATP aus ADP phosphoryliert (Nisman, 1954; Cary et al., 1988; Wiesenborn et al., 1989; Musfeldt und Schonheit, 2002). Im reduktiven Weg werden die im oxidativen Weg verbrauchten Reduktionsäquivalente (NADH) wieder regeneriert. Nach der Transaminierung folgt hier eine Reduktion zu der entsprechenden 2-Hydroxysäure über die Oxidation von NADH (Hetzel et al., 2003; Martins et al., 2005). Die nächsten Schritte sind eine Übertragung einer CoA-Gruppe und eine Dehydratisierung zum entsprechenden Enoyl-CoA (Dickert et al., 2000; Kim et al., 2004; Kim et al., 2008). Anschließend erfolgt die Bildung des Acyl-CoA über Elektronen-Bifurkation (Kapitel 1.1.3.2), wobei zwei NADH oxidiert werden. Im letzten Schritt wird das Coenzym A abgespalten, welches auf die 2-Hydroxysäure des zweiten Schritts übertragen werden kann (Kim et al., 2006).

1.3.2. Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation

Der Rnf-Komplex ist ein membrangebundener Enzymkomplex, der die Reduktion des NAD⁺ mit der Oxidation von reduziertem Ferredoxin koppelt (Schmehl et al., 1993; Biegel und Muller, 2010). Durch den Komplex werden Ionen über die Membran in Richtung des Gradienten transportiert, indem die Potentialdifferenz von Ferredoxin (- 500 mV) und NAD⁺ (- 280 mV) ausgenutzt wird (Buckel and Thauer, 2018a; Abb. 5). Die dafür genutzten Ionen in *C. difficile* sind nicht bekannt, in *Clostridium ljungdahlii* (Tremblay et al., 2012) und *Clostridium autoethanogenum* (Mock et al., 2015) wurden sie als Protonen identifiziert.

Die Reduktion des Ferredoxins findet entweder durch die Elektronen-Bifurkation oder durch Ferredoxin-abhängige Dehydrogenasen (EC 1.2.7.-), wie sie in den oxidativen Stickland-Reaktionen vorkommen, statt. Hierdurch wird die Reduktion eines Substrates

durch NADH an die Reduktion von Ferredoxin mit NADH gekoppelt (Abb. 5). Bei den Substraten handelt es sich oft um Derivate des Coenzym A (CoA) (Bertsch et al., 2013). Die Regeneration von Reduktionsäquivalenten durch die Oxidation von NADH kann auch über den Wood-Ljungdahl-Weg erfolgen.

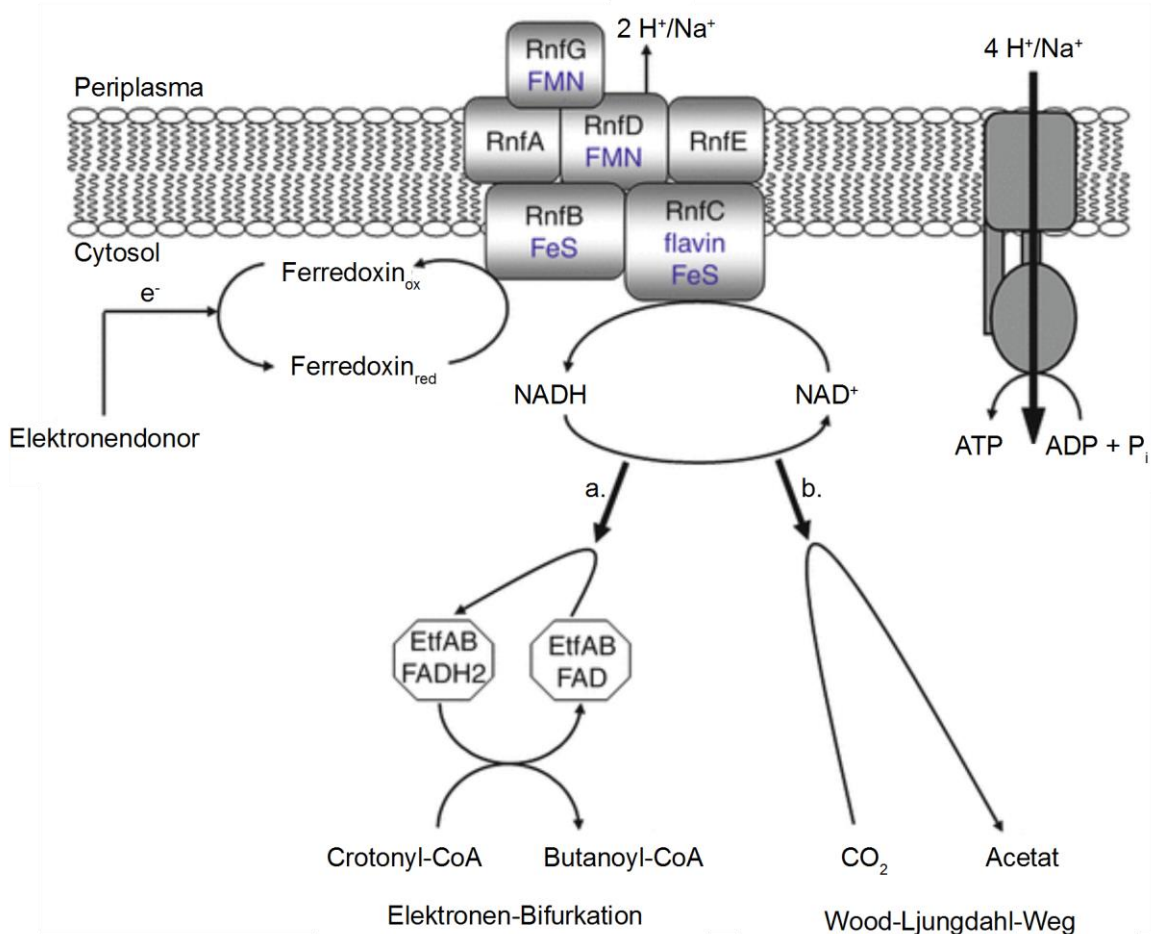


Abb. 5: Modell des Elektronentransports über den Rnf-Komplex und Elektronen-Bifurkation oder Wood-Ljungdahl-Weg. Die Elektronenbifurkation wird am Beispiel der Butyryl-CoA-Dehydrogenase gezeigt, die die Reaktion von Crotonyl-CoA zu Butanoyl-CoA katalysiert. Die Richtung der Pfeile gibt die übliche Flussrichtung an. Angepasst nach (Müller and Biegel, 2013).

Enzyme mit einer Elektronen-Bifurkation sind für verschiedene Stoffwechselwege in *C. difficile* annotiert, u.a. die Isocaproyl-CoA-Dehydrogenase in der reduktiven Stickland-Reaktion für Leucin und Phenylalanin, die Butyryl-CoA-Dehydrogenase in der Buttersäuregärung und eine Lactatdehydrogenase (Weghoff et al., 2015; Dannheim et al., 2017a).

Die über Elektronen-Bifurkation laufende Lactatdehydrogenase (EC 1.1.98.-) ist neben der L-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) das zweite Enzym, welches eine Reaktion zwischen Pyruvat und Lactat katalysiert. Das Redoxpotenzial des Lactat/Pyruvat ist mit

ca. -190 mV deutlich höher als die Potentiale von NAD^+ (-320 mV) und Ferredoxin (-500 mV) und ermöglicht die Kopplung der beiden Reaktionen (Abb. 6). Das Gleichgewicht dieser Reaktion wird damit konzentrationsabhängig auf die Seite des Pyruvats verschoben (Weghoff et al., 2015; Dannheim et al., 2017a). Dies ermöglicht die Produktion von Pyruvat und NADH unter physiologischen Bedingungen, wenn Lactat vorhanden ist.

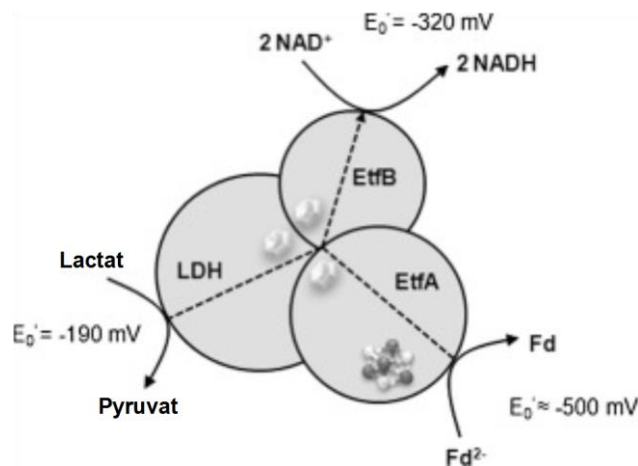


Abb. 6: Vorgeschlagenes Modell der Elektronen-Bifurkation über den Lactatdehydrogenase/Etf-Komplex. Angepasst aus (Weghoff et al., 2015).

1.3.3. Zentralstoffwechsel und Buttersäuregärung

Verschiedene Fermentationen des Zentralstoffwechsels bilden eine weitere Möglichkeit, Reduktionsäquivalente zu regenerieren. Glucose und andere metabolisierbare Zucker werden in *C. difficile* über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut (Bard und Gunsalus, 1950; Schreiber und Dürre, 1999). Auch einige Aminosäuren gelangen über Pyruvat oder das Zwischenprodukt Acetyl-CoA in den Zentralstoffwechsel (Lewis und Elsdén, 1955). In der Milchsäuregärung werden bei der Bildung von Lactat aus Pyruvat zwei NADH oxidiert (Contag et al., 1990; Ozkan et al., 2004). Über das Zwischenprodukt Acetyl-CoA werden Acetat, Propanoat und Butanoat gebildet (Schweiger und Buckel, 1984; Hetzel et al., 2003; Abounaga et al., 2013).

In der klassischen Buttersäuregärung werden im ersten Schritt zwei Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA und Coenzym A umgesetzt, katalysiert durch die Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase (Sliwkowski und Hartmanis, 1984; Wiesenborn et al., 1988). Die nächsten Schritte sind eine Reduktion zu 3-Hydroxybutanoyl-CoA (Hugo et al., 1972; Boynton et al., 1996) und eine Dehydratisierung zu Crotonyl-CoA (Scherf und Buckel, 1993; Boynton et al., 1996; Abounaga et al., 2013). Es folgt eine weitere Reduktion zu

Butanoyl-CoA, die über eine Elektronen-Bifurkation verläuft (Boynton et al., 1996; Li et al., 2008; Aboulnaga et al., 2013). Beide Reduktionsschritte beinhalten die Oxidation von NADH (Hugo et al., 1972; Sliwkowski und Hartmanis, 1984; Boynton et al., 1996; Aboulnaga et al., 2013). Im letzten Schritt wird Butanoat über ein phosphoryliertes Zwischenprodukt gebildet und darüber ein ADP phosphoryliert (Valentine und Wolfe, 1960; Cary et al., 1988; Wiesenborn et al., 1989). Über die Enzyme der Buttersäuregärung können auch höherkettige Produkte wie Pentanoat, Hexanoat und 5-Methylhexanoat gebildet werden (Dannheim et al., 2017a). Über die Alkoholdehydrogenase werden die entsprechenden CoA-Derivate außerdem zu den Alkoholen Ethanol, Propanol, 1-Butanol und höherkettigen Alkoholen umgesetzt (Ismail et al., 1993; Nair et al., 1994; Fontaine et al., 2002).

1.3.4. Wood-Ljungdahl-Weg

Neben den reduktiven Stickland-Reaktionen und dem Zentralstoffwechsel und der Buttersäuregärung ermöglicht auch der Wood-Ljungdahl-Weg die Regeneration von Reduktionsäquivalenten durch die Oxidation von NADH. In diesem Weg werden zwei Moleküle CO_2 als Elektronenakzeptoren verwendet und zu Acetat reduziert (Ljungdahl, 1986; Ragsdale, 1997). Dieser Weg wird auch als reduktiver Acetyl-CoA-Weg bezeichnet. Im ersten Reaktionsschritt wird CO_2 zu Formiat reduziert, wobei NADPH oxidiert wird. In den folgenden Reaktionsschritten werden Tetrahydrofolat-Zwischenprodukte gebildet. Im letzten Schritt wird über einen Acetyl-CoA-Synthase-Komplex das Produkt Acetyl-CoA gebildet (Ragsdale, 1997).

In 28 sequenzierten Stämmen von *C. difficile* wurden die entsprechenden Enzyme 2013 nachgewiesen (Köpke et al., 2013). Darüber hinaus konnte für das klinische Isolat *C. difficile* 630 und eng verwandte Stämme gezeigt werden, dass diese autotroph auf $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ als einzigem Kohlenstoff- und Energieträger wachsen, obwohl nur geringes Wachstum beobachtet werden konnte.

1.4. Systembiologie

Das Ziel der Systembiologie ist es, das biochemische Netzwerk und dessen Dynamik in einem komplexen biologischen System zu verstehen. Dafür werden mehrere große Datensätze mit einer computergestützten Modellierung kombiniert, um ein detailliertes Abbild eines Systems als Reaktion auf einen definierten Einflussfaktor darzustellen (Dettmer et al., 2007). Als experimentelle Basis werden vier sogenannte „Omics“

Fachgebiete genutzt: die Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik (Abb. 7). Des Weiteren können Daten aus verschiedenen anderen Fachrichtungen wie die *in vitro* Biochemie, die Glykomik oder die Lipidomik genutzt werden, um die Rekonstruktion der komplexen biochemischen Netzwerke zu vervollständigen (Kirschner et al., 2005).

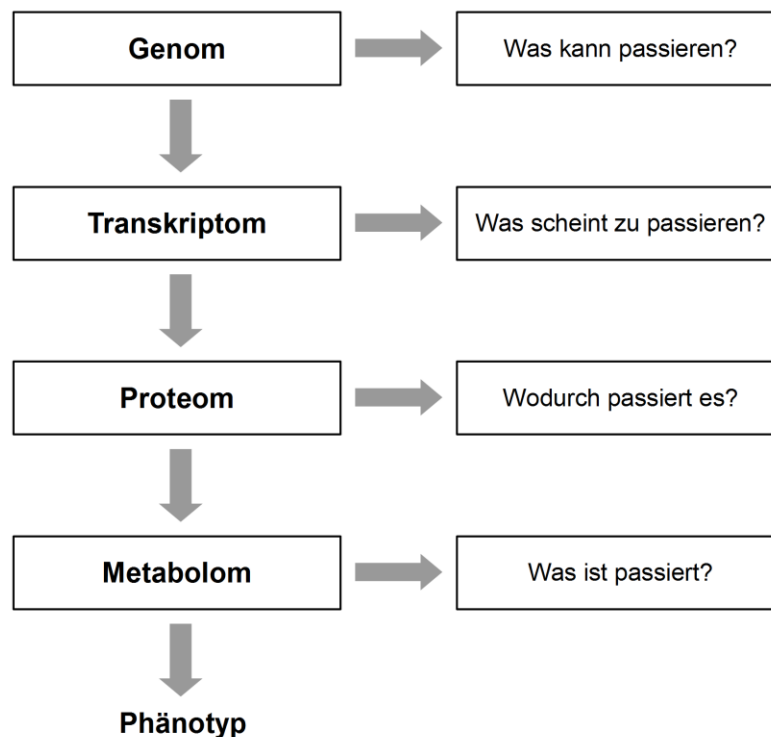


Abb. 7: Die „Omics“-Kaskade. Die Kaskade umfasst komplexe Datensätze, die als Einheit die Reaktion biologischer Systeme auf Krankheits-, Gen- und Umweltstörungen umfassend beschreiben, angepasst aus (Dettmer et al., 2007).

Das Genom liefert Informationen über Möglichkeiten und Einschränkungen im Organismus und bildet somit die Grundlage für die Interpretation der weiteren Omics-Techniken.

Das Transkriptom liefert Informationen darüber, welche Möglichkeiten des Genoms genutzt werden. Es beschreibt die globale Analyse der Genexpression im untersuchten System zu einem definierten Zeitpunkt. Im Gegensatz zum Genom ist das Transkriptom hochdynamisch. Transkriptionelle Reaktionen auf spezifische Veränderungen können in der Regel nach wenigen Minuten bis zu einigen Stunden beobachtet werden. Die gängigsten Techniken der Transkriptomik sind die RNA-Sequenzierung und DNA-Microarrays (Wang et al., 2009; Tachibana, 2015).

Das Proteom umfasst die unter bestimmten Bedingungen vorhandenen Proteine zu einem definierten Zeitpunkt. Es liefert wichtige Informationen über den aktuellen

Zustand des Stoffwechsels und die enzymatische Aktivität des Systems. Die wichtigsten Methoden in der Proteomik sind die 2D-Differenzgelelektrophorese (2D-DIGE), mit der lösliche Proteine analysiert werden können, und die Flüssigchromatographie in Verbindung mit einem matrixgestützten Laserdesorptions-/Ionisationsmassenspektrometer (Cox and Mann, 2011).

Das Metabolom umfasst alle intrazellulären und extrazellulären Metaboliten eines Systems. Die Reaktionen auf veränderte Bedingungen werden innerhalb von Sekunden sichtbar, noch bevor genregulatorische Mechanismen aktiviert werden. Aufgrund der chemischen und physikalischen Komplexität von Zwischenprodukten und den großen Konzentrationsbereichen stellt es den komplexesten „Omics“-Ansatz dar, kommt aber auch dem Phänotyp eines Organismus am nächsten (Dettmer et al., 2007).

1.5. Metabolomik

1.5.1. Metabolomanalyse

Das Metabolom beschreibt den Pool an kleinen Molekülen in einem System (z.B. ein Organismus) zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen (Rochfort, 2005). Das Ziel der Metabolomanalyse ist es, alle kleinen Moleküle in einer Probe zu charakterisieren (Fiehn, 2002; Villas-Bôas et al., 2005). Aufgrund der großen Anzahl an Verbindungen, die sich chemisch und physikalisch stark unterscheiden können, und des großen Konzentrationsbereichs der Verbindungen, ist es nicht möglich das komplette Metabolom mit einer einzigen Technik zu erfassen (Allwood and Goodacre, 2010). Die Wahl der richtigen Analysenmethode hängt daher vom Ziel ab und es können mehrere Ansätze erforderlich sein, um den Großteil der Metabolite abzudecken.

Bisher durchgeführte Metabolomstudien basieren auf den Prinzipien des metabolischen Profils oder des metabolischen Fingerabdrucks. Das Prinzip des metabolischen Fingerabdrucks wird verwendet, um eine große Anzahl von Metaboliten zu vergleichen. Dabei geht es nicht um die Identifizierung aller Metabolite, sondern um die Bestimmung von charakteristischen Mustern für die definierte Bedingung, z.B. Umwelteinflüsse, Krankheiten oder genetische Manipulation (Nicholson und Lindon, 2008). Um zusätzliche Informationen über den physiologischen Zustand eines Systems zu erhalten, wird dabei oft auch das Exometabolom analysiert, welches die im Umgebungsmedium vorhandenen Metabolite darstellt. Das Prinzip des metabolischen Profils wird eingesetzt, wenn nur eine geringe Anzahl von Metaboliten identifiziert und quantifiziert wird, z.B. für einen

bestimmten Stoffwechselweg oder eine bestimmte Substanzklasse (Fiehn, 2002; Dettmer et al., 2007).

1.5.2. Probenvorbereitung und Derivatisierung

Aufgrund der hohen Dynamik des Systems ist die Probenvorbereitung eine sehr anspruchsvolle Aufgabe. Der erste Schritt ist das schnelle Abstoppen der Enzymaktivität, um Veränderungen im Stoffwechsel zu vermeiden. Dies gestaltet sich in bakteriellen Zellsuspensionen als schwierig, da diese nicht ohne vorherige Abtrennung des umgebenden Mediums in flüssigem Stickstoff eingefroren werden können (Fiehn, 2002; Dettmer et al., 2007; Spura et al., 2009). Die Trennung kann durch Zentrifugation oder Filtration erfolgen. In einem weiteren Schritt müssen die Zellen gewaschen werden, um extrazelluläre Stoffwechselprodukte möglichst vollständig zu entfernen. Dazu muss eine Lösung mit geeigneter Ionenstärke verwendet werden, um eine Schädigung der Zellen und den damit verbundenen Verlust von Metaboliten zu vermeiden (Bolten et al., 2007; Spura et al., 2009).

Eine alternative Methode ist das sogenannte *Quenching*. Bei dieser Methode werden temperierte und gepufferte organische Lösungsmittel verwendet, die in die Zelle gelangen, ohne die Zellintegrität zu beeinträchtigen und zur Denaturierung der Proteine führen. Solche Methoden müssen an den jeweiligen Organismus angepasst werden, um eine Schädigung der Zellen zu minimieren (Bolten et al., 2007; Spura et al., 2009).

Die Extraktionsmethoden werden den Zielmetaboliten angepasst. In der Regel werden Flüssig-Flüssig-Extraktionen oder Festphasenextraktionen mit einem anschließenden Konzentrationsschritt durchgeführt, um auch niedrig konzentrierte Metabolite zu erfassen (Dettmer et al., 2007).

1.5.3. Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer ist eine der am häufigsten genutzten Techniken für die Metabolomanalyse im Hochdurchsatzverfahren (Dettmer et al., 2007). Mit dieser Methode kann ein breites Spektrum an Metaboliten, bis zu einer Masse von 1000 Da, abgedeckt werden. Flüchtige Verbindungen können mittels einer sogenannten *Headspace*-Technik analysiert werden, bei der eine Probe aus einem Gasraum genommen wird, nachdem eine Gleichgewichtseinstellung über eine Temperierung erreicht wurde (Zhang und Pawliszyn, 2002).

Nicht flüchtige und sich leicht zersetzende Substanzen müssen vor der Analyse

derivatisiert werden, um sie thermostabil und verdampfbar zu machen (Halket and Zaikin, 2003). In dieser Arbeit wurden die Metabolite mit *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) silyliert (Abb. 8). Mit dieser Methode werden labile Wasserstoffatome durch Silylgruppen ersetzt. Diese Substitution verbessert die Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln und trennt Wasserstoffbrücken, wodurch die Flüchtigkeit der Metabolite verbessert wird. Einige Metabolite weisen mehrere labile Wasserstoffatome auf, was zu verschiedenen silylierten Derivaten eines Metaboliten führt (Kanani and Klapa, 2007). Diese Derivate müssen nach der Prozessierung der Daten addiert werden, da sich das Verteilungsmuster unterscheiden kann. Um die Anzahl der Derivate für die Klasse der Kohlenhydrate zu verringern, wird ein weiterer Derivatisierungsschritt durchgeführt. Dabei werden die Carbonylgruppen durch eine Methoxyaminingruppe ersetzt, wodurch die offenkettige Form der Zucker stabilisiert wird (Herderich and Schreier, 1993).

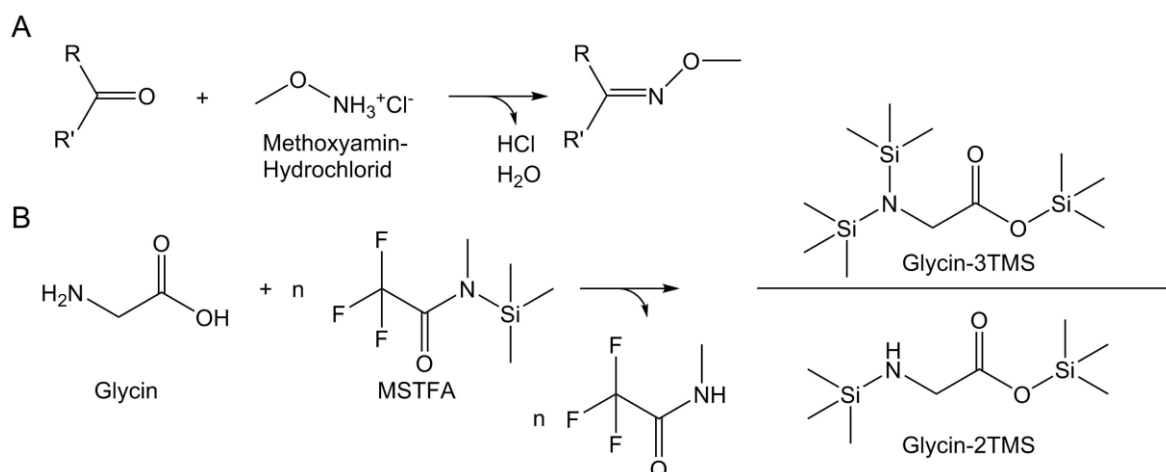


Abb. 8: Derivatisierungsreaktionen für die GC-MS-Analyse. A: Umsetzung von Carbonylgruppen mit Methoxyamin-Hydrochlorid. B: Silylierung mit MSTFA am Beispiel Glycin. MSTFA: *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid, TMS: Trimethylsilyl.

Bei der Injektion flüssiger Proben werden diese durch eine temperaturprogrammierte Verdampfung (PTV) im Injektor in den gasförmigen Zustand überführt. Die derivatisierten Metabolite werden kontinuierlich durch einen Temperaturgradienten verdampft und gelangen so schon vorsepariert in das GC-System (Stan and Linkerhägner, 1996).

Im GC-System werden die Analyten mit Hilfe eines inerten Trägergases, z.B. Helium, über eine beschichtete Säule geführt. Durch die Interaktion der Analyten mit dem Säulenmaterial verändert sich die Retentionszeit. Die Interaktion variiert aufgrund der Struktur und der funktionellen Gruppen der Analyten. Dadurch werden die Substanzen

nach Masse, sterischer Konfiguration und weiteren Parametern einzeln getrennt. In den meisten Fällen wird für die Trennung zusätzlich ein Temperaturgradient verwendet (Cremer and Roselius, 1958).

Zur Bestimmung der Massen im Massenspektrometer müssen die Substanzen zunächst ionisiert werden. Meistens wird dazu die Elektronenionisation (EI) verwendet, wobei eine Elektronenenergie von 70 eV aufgebracht wird. Die Elektronenionisation ist eine sogenannte „harte Ionisierung“, wodurch für die Substanzen charakteristische Fragmente entstehen (Strehmel et al., 2008). Die ionisierten Verbindungen werden im Massenspektrometer detektiert. Die daraus resultierenden Spektren sind für jede Verbindung individuell und können für die Identifizierung der Substanzen genutzt werden (Dettmer et al., 2007).

1.5.4. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Der Vorteil der Flüssigchromatographie im Vergleich zur Gaschromatographie ist die Möglichkeit, auch Metabolite mit höheren Massen zu analysieren (Lu et al., 2008). In dieser Arbeit wird die Methode für die Bestimmung von Derivaten des Coenzym A verwendet. Durch die mittlerweile sehr große Anzahl an verschiedenen Säulen und mobilen Phasen bietet sich ein breites Spektrum für die Trennung von Substanzen. Meistens wird eine weiche Ionisierungsmethode verwendet, in diesem Fall die Elektrospray-Ionisation (ESI). Bei der ESI wird die Analytlösung durch eine angelegte Spannung in ein feines Aerosol überführt und die Molekülkationen $[M+H]^+$ oder $[M+H]^-$, je nach angelegter Spannung, gebildet (Fenn et al., 1989). Mit den Informationen der akkuraten Masse und dem Isotopenmuster ist es möglich, eine Formel für das Molekül vorherzusagen. Diese Informationen können dabei helfen, nicht identifizierte Metabolite aufzuklären (Evans et al., 2009). Der Nachteil dieser Methode ist eine höhere geräteabhängige Variabilität, wodurch sich die Ionisation, die Spektren und die Retentionszeiten zwischen verschiedenen Messungen schwer vergleichen lassen. Dies erschwert die Standardisierung der Messmethoden, welche zum Aufbau von Substanzbibliotheken benötigt wird (Dettmer et al., 2007).

1.6. Zielsetzung

Der humanpathogene Krankenhauskeim *C. difficile* hat sich in den letzten Jahren zu einem der häufigsten Erreger nosokomialer und Antibiotika-assoziiierter Darmerkrankungen entwickelt. Aufgrund der zunehmenden Verbreitung, der

Ausbildung hypervirulenter Stämme und der Zunahme tödlicher Verläufe bei der Infektion mit *C. difficile*, rückte die Entwicklung effektiver Therapeutika in das öffentliche Interesse.

Die Hauptvirulenzfaktoren von *C. difficile* sind die Toxine A und B, deren Produktion sich durch verschiedene äußere Faktoren beeinflussen lässt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die im Metabolom des Modellstamms *C. difficile* 630 Δ *erm* begründeten Veränderungen und Regulationen durch eine veränderte Substratzusammensetzung und den Zusammenhang zur Toxinproduktion zu verstehen. Durch das Verständnis des Zusammenhangs zwischen Metabolom und Toxinproduktion könnten sich neue strategische Ansätze für Therapeutika ergeben.

Im ersten Experiment wurden dafür eine Reihe Substrate ausgewählt und deren Einfluss auf die Toxinproduktion untersucht. Durch dieses Screening sollten Substrate gefunden werden, die die Toxinproduktion maßgeblich beeinflussen und die sich für weitere Untersuchungen eignen.

Im zweiten Experiment wurden die Zusammenhänge zwischen Metabolom und Toxinproduktion mit den Substraten Glucose, L-Lactat und Mannose untersucht. Um regulatorische Veränderungen erkennen zu können, wurden hier zudem Transkriptomstudien eingesetzt, die von Kooperationspartnern durchgeführt wurden.

Der Fokus der dritten Studie war der zeitliche Verlauf der Toxinproduktion im Zusammenhang mit dem Metabolom und die Veränderungen durch verschiedene Konzentrationen an Cystein. Hier sollten Erkenntnisse über die Toxinproduktion im Zusammenhang mit dem Wachstumsverlauf von *C. difficile* gesammelt werden.

Im letzten Experiment wurde die Toxinproduktion von verschiedenen Isolaten von *C. difficile* analysiert. Hier wurde untersucht, ob sich die im Modellstamm *C. difficile* 630 Δ *erm* gesammelten Erkenntnisse über den Zusammenhang zum Metabolom auf die Isolate übertragen lassen und ob Unterschiede zu nicht-toxischen Stämmen existieren.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden handelsübliche Chemikalien und Reagenzien mit den Reinheitsgraden „zur Analyse (p.a.)“, „reinst“ oder „HPLC-MS-grade“ und „LC-MS-grade“ verwendet. Die Substanzen wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland), CS GmbH (Langerwehe, Deutschland) und Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen.

2.2. Software und Datenbanken

Tab. 1: Übersicht über in der Arbeit verwendete Software und Datenbanken.

Software	Datenbanken
ChromaTOF (Version 4.24) Leco Instruments	Brenda (Placzek et al., 2017)
DataAnalysis (Version 4.0 SP5) Bruker Daltonik	KEGG (Kanehisa et al., 2016)
Hystar (Version 3.2) Bruker Daltonik	MetaCyc (Caspi et al., 2018)
Maestro (Version 1.4.15.4) Gerstel	National Center for Biotechnology
Itool	Information (NCBI, 2018)
MetaboliteDetector (Version 2013-01-15) (Hiller et al., 2009)	UniProt/Swiss-Prot (Boutet et al., 2016)
OriginLab Pro 2016G	
Tecan i-control 1.6	
Tigr MultipleExperimentViewer (Version 4.6.2) (Saeed et al., 2003)	
Xcalibur (Version 2.0.7) Thermo Fischer Scientific	
XCMS (Tautenhahn et al., 2012; Smith et. al, 2006)	

2.3. *Clostridioides difficile* Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Stammhaltung der Isolate ist in Kapitel 2.5.2 angegeben.

Tab. 2: Übersicht über verwendete *C. difficile* Stämme. Übersicht über den Ursprung der Stämme aus Ghana (GHA), Indonesien (IDN), Deutschland (D), Schweiz (CH) und dem Vereinigten Königreich (UK) mit Angabe der vorhandenen Toxingene für Toxin A, Toxin B und das binäre Toxin CDT. - negativ, + positiv, * Pseudogen. Referenzen (Ref.): [1] (Janssen et al., 2016) [2] (Riedel et al., 2017) [3] (Hussain et al., 2005) [4] (Stabler et al., 2009).

DSM Nr.	Ursprung	Klade	TcdA	TcdB	CDT	Beschreibung	Ref.
DSM 28666	GHA	1	-	-	-	Klinisches Isolat	[1]
DSM 29637	IDN	1	-	-	-	Klinisches Isolat	[2]
DSM 29688	D	1	-	-	-	Klinisches Isolat	[2]
DSM 29745	D	1	+	+	-	Klinisches Isolat	[2]
DSM 29632	IDN	1	+	+	-	Klinisches Isolat	[2]
DSM 28668	GHA	1	+	+	-	Klinisches Isolat	[1]
DSM 28645	CH/UK	1	+	+	-	PCR Ribotyp 012, Erythromycin sensibler Stamm	[3]
DSM 28196	D	2	+	+	+	Klinisches Isolat	[2]
DSM 27147	UK	2	+	+	+	Klinisches Isolat , R20291	[4]
DSM 102978	D	3	+	+	+	Klinisches Isolat	[2]
DSM 102859	D	3	+	+	+	Klinisches Isolat	[2]
DSM 102860	D	3	+	+	+	Klinisches Isolat	[2]
DSM 28669	GHA	4	-	-	-	Klinisches Isolat	[1]
DSM 29629	IDN	4	-	-	-	Klinisches Isolat	[2]
DSM 29627	IDN	4	-	+	-	Klinisches Isolat	[2]
DSM 28670	GHA	4	-	-	+	Klinisches Isolat	[1]
DSM 29747	D	5	+	+	+	Klinisches Isolat	[2]
DSM 29020	IDN	5	+	+	+	Klinisches Isolat	[2]
DSM 101085	D	5	+	-	+	Klinisches Isolat	[2]

2.4. Medien und Lösungen

Alle wässrigen Lösungen wurden mit salz- und partikelfreiem, sterilfiltrierten Reinstwasser (ddH₂O) hergestellt (Astacus², MembraPure, Henningsdorf, Deutschland).

2.4.1. Brain-Heart-Infusion Medium (BHI)

Als Komplexmedium wurden 37 g/L Brain-Heart-Infusion (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1 L ddH₂O gelöst und autoklaviert. Vor Verwendung wurde das Medium durch das Begasen mit Stickstoff (N₂) anerobisiert (Tab. 3).

Tab. 3: Begasungszeit zum Anaerobisieren des Mediums mit Stickstoff.

Volumen des Mediums [mL]	Begasungszeit [min]
10 (Hungate)	5
100	10
250	20
500	30
1000	30

2.4.2. Caseinhydrolysat-Medium

Das Caseinhydrolysat-Medium basiert auf dem „*Clostridium difficile* Minimalmedium“ (Cartman and Minton, 2010). Es wurde mit einigen Änderungen nach Neumann-Schaal et al. (2015) verwendet. Das Medium wurde direkt vor der Kultivierung durch die Kombination verschiedener Stocklösungen in ddH₂O hergestellt. Der Salzmix wurde autoklaviert, die restlichen Lösungen wurden steril filtriert. Der Casamino-Mix, das Eisen und die Vitamine wurden bei – 30°C gelagert. Nach dem Ansetzen wurde das Medium durch das Begasen mit Stickstoff (N₂) anaerobisiert (Tab. 3).

Salzmix: finale Konzentration im Medium [g/L]

Na ₂ HPO ₄	5
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	0,9
NaCl	0,9

Casamino-Mix: finale Konzentration im Medium [g/L]

Caseinhydrolysat (Roth/Merck)	10
L-Cystein*	0,5
L-Tryptophan	0,1

Der Casamino-Mix wurde auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt.

*Um den Einfluss von Cystein auf den Stoffwechsel und die Toxinproduktion zu untersuchen (Kapitel 3.3), wurde die Cysteinkonzentration im Casamino-Mix durch das Weglassen des Cysteins bzw. eine Erhöhung auf 2 g/L angepasst.

Spurensalze: finale Konzentration im Medium [mg/L]

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	40
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	26
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	20
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	10
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	1

Eisen: finale Konzentration im Medium [mg/L]

$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	6
--	---

Vitamine: finale Konzentration im Medium [mg/L]

D-Biotin	0,3
Ca-D-Panhotenat	1
Pyridoxin	1

Zusätzliche Kohlenstoffquelle:

In den in Kapitel 3.2 bis 3.5 durchgeführten Versuchen wurde die zusätzliche Kohlenstoffquelle je nach Fragestellung angepasst (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete Medien in den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen.

Kapitel	Verwendete Medien
3.2.1	Caseinhydrolysat-Medium ohne Zusatz, mit 2 g/L Glucose (CDMM) und 10 g/L Glucose
3.2.1	Caseinhydrolysatmedium ohne Zusatz und mit 0,5 g/L L-Lactat
3.2.3	Caseinhydrolysatmedium mit 2 g/L Glucose (CDMM) bzw. 2 g/L Mannose
3.3	CDMM
3.4	CDMM, ohne Cystein und mit 2 g/L Cystein
3.5	CDMM

Im Kapitel 3.1 wurden verschiedene Kohlenstoffquellen (Tab. 5) verwendet.

Tab. 5: In Kapitel 3.1 verwendete Kohlenstoffquellen. Die Kohlenstoffquellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem zur Referenz (2 g/L Glucose) äquivalenten Kohlenstoff-Verhältnis eingesetzt. * Aufgrund der polymeren Struktur von Inulin und Pektin wurde die eingesetzte Menge in g/L anhand der monomeren Hauptkomponente berechnet. ** Für die Süßstoffe wurde eine für Limonaden übliche Konzentration eingesetzt.

Kohlenstoffquelle	Finale Konzentration im Medium [mM]
Glucose	11,1 (2 g/L), 27,8 (5 g/L), 55,5 (10 g/L)
Fructose, Mannose, meso-Innositol, Mannitol	11,1
N-Acetylglucosamin	8,3
Glycerol	22,2
Lactose, Lactulose, Trehalose	5,6
Xylose, Xylitol	13,3
Inulin (Alfa Aesar)	(1,8 g/L) *
Pektin A (Roth)	(1,8 g/L) *
Arginin, Histidin, Leucin	11,1
Cystein, Serin	22,2
Glycin	33,3
Phenylalanin	7,4
Prolin	13,3
Acesulfam K	1,24 (250 mg/L) **
Aspartam	0,85 (250 mg/L) **
Cyclamat	1,24 (250 mg/L) **
Saccharin	1,36 (250 mg/L) **

2.4.3. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Die folgenden Salze [g] wurden in 1 L ddH₂O gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde durch die Begasung mit Stickstoff (N₂) anaerobisiert und bei 4 °C gelagert.

NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,42
KH ₂ PO ₄	0,27

2.4.4. Lösungen für die Metabolomanalyse

Interner Standard: o-Cresol-Lösung

2 µL o-Cresol wurden in 250 mL ddH₂O gelöst. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht.

Interner Standard: Ribitol-Stocklösung

Die Lösung wurde aus 0,2 g/L Ribitol hergestellt und in Aliquots bei – 20 °C gelagert.

Methanol-Ribitol-Lösung

49 mL Methanol wurden mit 1 mL Ribitol Stocklösung versetzt und bis zur Verwendung bei – 30 °C gelagert.

Quenching-Lösung

Eine 0,9 %ige NaCl-Lösung wurde 1:1 mit Methanol versetzt. Die Lösung wurde in 15 mL Aliquots bei – 30 °C gelagert.

Derivatisierungsreagenz

Für die Online-Derivatisierung wurden 20 mg/mL Methoxyamin-Hydrochlorid in Pyridin gelöst (Methoxyamin-Pyridin-Lösung). N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) wurde unverdünnt verwendet.

Akan-Standardmix zur Bestimmung des Retentionsindex

Die folgenden Alkane [mg] wurden in 25 mL Cyclohexan gelöst. Für die GC-Messung wurden 6 µL dieser Stammlösung mit 42 µL Cyclohexan verdünnt und in Aliquots bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Decan, C ₁₀ H ₂₂	12,5 (17,1 µL)
Dodecan, C ₁₂ H ₂₆	12,5 (16,7 µL)
Pentadecan, C ₁₅ H ₃₂	12,5 (16,2 µL)
Nonadecan, C ₁₉ H ₄₀	12,5
Docosan, C ₂₂ H ₄₆	12,5
Octacosan, C ₂₈ H ₅₈	12,5
Dotriacontan, C ₃₂ H ₆₆	12,5
Hexatriacontan, C ₃₆ H ₇₄	12,5

2.4.5. Puffer und Lösungen für die CoA-Analytik

Ammoniumformiat (Eluent A)

Für den Eluent A wurden 943 μL Ameisensäure in 500 mL Wasser gelöst und der pH mit einer 1:2 verdünnten Ammoniumhydroxidlösung auf pH 8,1 eingestellt. Die Lösung wurde direkt vor der Verwendung hergestellt und für 30 min im Ultraschallbad entgast.

Methanol (Eluent B), Wasser (Eluent C)

Die Eluenten B und C wurden vor Verwendung frisch abgefüllt und im Ultraschallbad für 30 min entgast.

Natriumformiat-Cluster (Kalibrationsmix)

Zur Kalibrierung der Massen wird ein Natriumformiat-Kluster verwendet. Dafür wurden folgende Komponenten gemischt und die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

ddH ₂ O	4,95 mL
Isopropanol	4,95 mL
Ameisensäure	10 μL
1 M NaOH	100 μL

Probenpuffer

Es wurde eine Lösung aus 40 mL ddH₂O und 47,2 μL Ameisensäure hergestellt. Der pH-Wert wurde mit 1:2-verdünnter Ammoniumhydroxidlösung auf pH 3,5 eingestellt. Nach der Zugabe von 1 mL Methanol wurde die Lösung auf 50 mL aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

2.4.6. Puffer und Lösungen für die Aminosäure-Analytik

Natriumtetraphenylborat

Eine 0,25 mM Tetraphenylboratlösung in ddH₂O wurde direkt vor der Verwendung hergestellt.

Natriumacetat (Eluent A)

Direkt vor der Verwendung wurde eine 25 mM Natriumacetatlösung hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt und die Lösung wurde sterilfiltriert.

Derivatisierungsreagenz

Die Reagenzien OPA (jeweils 10 mg/mL O-Phthalaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure in 0,4 M Boratpuffer) und Fmoc (2,5 mg/mL 9-Fluorenylmethylchloroformat in Acetonitril) und ein Boratpuffer (0,4 N, pH 10,2) wurden von der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) bezogen. Nach dem Öffnen wurden die Reagenzien aliquotiert, bei 4 °C gelagert und für die Dauer von maximal 10 Tagen verwendet.

Injektionslösung zum Verdünnen (*Diluent*)

Jeweils 100 mL einer 10 mM Na₂HPO₄ und einer 10 mM Na₂B₄O₇ wurden gemischt und mit 0,4 mL konzentrierter Phosphorsäure versetzt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Aminosäure-Standardmix

Ein 1 mM Aminosäure Standardmix wurde von der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) bezogen. Zur Erstellung von Kalibriergeraden wurden Lösungen in einer Konzentration zwischen 10 und 500 µM in 0,1 M Salzsäure hergestellt. Die verdünnten Lösungen wurden bei – 20 °C gelagert.

Interner Standard für die Aminosäurebestimmung

Als interner Standard wurde eine Lösung mit 1 mM Norvalin und 1 mM Sarcosin hergestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.5. Mikrobiologische Techniken

2.5.1. Zelldichte-Bestimmung

Die Zelldichte flüssiger Bakterienkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Falls nötig, wurden die Kulturen mit ddH₂O verdünnt. Die Berechnung der Biotrockenmasse (BTM) über die optische Dichte erfolgte über folgende Formel:

$$BTM \left[\frac{mg}{mL} \right] = 0,425 * OD_{600nm} \quad (1)$$

2.5.2. Stammhaltung

Die Stammhaltung wurde in 50 mL CDMM in 100 mL Afnor-Flaschen und in 10 mL BHI-Medium in Hungates durchgeführt. Für die Stammkulturen wurde das gefriergetrocknete

Zellpellet des jeweiligen Stamms von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) nach dem Öffnen der Ampulle in das Anaerobzelt eingeschleust. Das Pellet wurde in 1 mL CDMM gelöst und je 500 µL der Zellsuspension wurden in das BHI-Hungate und die 50 mL CDMM überführt. Die Kulturen wurden für 24 – 48 h bis in die späte stationäre Phase bei 37 °C kultiviert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Stammkulturen wurden alle 4 – 6 Wochen erneuert, indem jeweils eine neue BHI- und CDMM-Kultur aus den vorherigen Stammkulturen überimpft und kultiviert wurden. Je nach Experimentaufkommen wurden die Stammkulturen alle 3 – 6 Monate durch neue Kulturen aus gefriergetrockneten Zellpellets der DSMZ ersetzt.

2.5.3. Kultivierungsbedingungen

Alle Kultivierungen wurden in gasdichten Afnorflaschen (100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L) oder Hungate-Röhrchen bei 37 °C ohne Schütteln durchgeführt. Das angesetzte Medium wurde in den Flaschen durch das Begasen mit Stickstoff (N₂), je nach Volumen zwischen 10 und 30 min, anaerobisiert. Aus der vorhandenen Stammkultur wurde eine Vorkultur 1 im CDMM 1:100 inokuliert und bis in die späte exponentielle oder stationäre Phase kultiviert.

Aus der Vorkultur 1 wurde in eine weitere CDMM-Vorkultur 2 auf eine OD von 0,01 – 0,05 überimpft und diese bis in die mittlere bis späte exponentielle Phase kultiviert. Aus dieser Kultur wurden die Hauptkulturen je nach experimentellem Setup auf eine Start-OD von 0,01 bis 0,05 überimpft.

2.5.4. Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ

Die Zunahme der Biomasse von Mikroorganismen über die Zeit wird durch folgende Formel beschrieben:

$$\frac{dBTM}{dt} = \mu \times BTM \quad (2)$$

BTM entspricht der Biotrockenmasse, $\frac{dBTM}{dt}$ gibt die Änderung der Biotrockenmasse über die Zeit an und μ steht für die spezifische Wachstumsrate. Eine Integration über einen spezifischen Zeitrahmen von t_0 bis t ergibt folgende Formel für μ :

$$\mu = \frac{(\ln(BTM) - \ln(BTM_0))}{(t - t_0)} \quad (3)$$

2.6. Probenahme

Die Kultivierungen für die Probenahme von Metabolomproben wurden in Afnorflaschen durchgeführt. Je nach experimentellem Setup variierten die Stämme, das Medium und die Probenahme-Zeitpunkte. Vor den Probenahmen wurde die aktuelle optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

2.6.1. Probenahme für die GC-MS

Je 45 mL der Kultur wurden anaerob in gasdichte Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). 6 mL des Überstands wurde in 2 mL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Analyse der extrazellulären Metabolite bei – 80 °C gelagert. Weitere 2 mL Kulturüberstand wurden sterilfiltriert und für die Toxinquantifizierung bei 4 – 8 °C gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 15 mL – 30 °C kalter Quenching-Lösung resuspendiert und bei – 10 °C zentrifugiert (10.000 rpm, 5min). Die Quenching-Lösung wurde verworfen und die Zellpellets, nachdem sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, bei – 80 °C gelagert.

2.6.2. Probenahme für die CoA-Analyse

Je 30 mL der Kultur wurden anaerob in gasdichte Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets für die CoA-Analyse wurden in einer Konzentration von 7 mg Biotrockenmasse pro Milliliter Methanol resuspendiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei – 80 °C gelagert.

2.6.3. Probenahme für die Transkriptomanalyse

Je 45 mL der Kultur wurden anaerob in gasdichte Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets für die Transkriptomanalyse direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.6.4. Probenahme für die Proteomanalyse

Für die Proteomanalyse wurden die entsprechenden Volumina je nach Zeitpunkt (Tab. 6) anaerob in gasdichte Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 30 min, 4 °C). Der sterilfiltrierte Überstand und die Zellpellets wurden separat in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tab. 6: Übersicht über Erntevolumen für die Proteomanalyse.

Zeitpunkt	Erntevolumen [mL]
Exp	420
Trans	250
Stat1	180
Stat2	180
Stat3	180

2.7. Aufarbeitung für die GC-MS Analyse

2.7.1. Extraktion der intrazellulären Metabolite

Über die optische Dichte wurde nach Formel (1) die Biotrockenmasse der Probe berechnet. Das Zellpellet wurde in einer Konzentration von 1,5 mL Methanol-Ribitol-Lösung (Kapitel 2.4.4) pro 10 mg Biotrockenmasse resuspendiert. Die Zellen wurden im Ultraschallbad für 15 min bei 70 °C lysiert und anschließend auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1,5 mL ddH₂O pro 10 mg BTM wurde die Lösung kräftig gemischt. Es folgte eine Zugabe von 1 mL Chloroform pro 10 mg BTM und erneutes kräftiges Mischen für 1 min. Eine Phasentrennung wurde durch Zentrifugation erreicht (10.000 rpm, 5 min, 4 °C). 1 mL der oberen polaren Phase wurde in Glasvials überführt und unter Vakuum bei 4 °C eingetrocknet. Wenn genügend polare Phase vorhanden war, wurden Backup-Proben erstellt. Die getrockneten Proben wurden bei – 80 °C gelagert.

2.7.2. Präparation des Überstands

In Glasvials wurden 10 µL des Kulturüberstandes mit 500 µL Ethanol-Ribitol versetzt. Für die Ethanol-Ribitol-Lösung wurden 49 mL Ethanol mit 1 mL der Ribitol-Stocklösung versetzt. Die Proben wurden unter Vakuum bei 4 °C getrocknet und bei – 80 °C gelagert.

2.7.3. Extraktion flüchtiger Metabolite aus dem Überstand

400 µL zellfreier Kulturüberstand wurden mit 600 µL *o*-Cresol-Lösung, 60 µL Schwefelsäure (50 %, HPLC-grade) und 200 µL *tert*-Butylmethylether versetzt. Nach kräftigem Mischen (2.000 rpm, 5 min) wurden die Phasen mittels Zentrifugation getrennt (13.000 rpm, 5 min, 4 °C). 100 µL der Etherphase wurden in Glasvials mit Inlet überführt und direkt am DSQ II gemessen (Kapitel 2.8.2).

2.7.4. Derivatisierung

In einer Zwei-Stufen-Derivatisierung der intrazellulären und extrazellulären Metabolite (Kapitel 2.7.1 und 2.7.2) wurden die Carbonylgruppen durch eine Methoxylgruppe substituiert und die Amino- und Hydroxylgruppen silyliert. Die Derivatisierung wurde automatisch direkt vor der Messung von einem Pipettierroboter mit einer mVorx-Einheit (MPS2; Gerstel, Mülheim a. d. Ruhr, Deutschland) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 40 µL Methoxyamin-Pyridin-Lösung zur getrockneten Probe gegeben und diese im mVorx kräftig gemischt (1.300 rpm, 1 min). Es folgte ein Inkubationsschritt bei 30 °C für 90 min mit konstanter Durchmischung. Im zweiten Schritt wurden der Lösung 60 µL MSTFA zugesetzt. Nach erneuter Vermischung im mVorx (1.300 rpm, 1 min) folgten eine Inkubation von 30 min bei 37 °C mit konstanter Durchmischung und eine Inkubation von 30 min bei 18 °C ohne Durchmischung.

2.8. Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Für die Metabolomanalysen wurden zwei unterschiedliche GC-MS-Systeme verwendet. Die Analyse der intrazellulären (Kapitel 2.7.1) und der nicht-flüchtigen extrazellulären Metabolite (2.7.2) wurde mit dem Leco Pegasus 4D GC x GC TOF MS (Leco Instrumente GmbH, Mönchengladbach, Deutschland) gemessen. Die flüchtigen Metabolite aus dem Überstand wurden nach der Etherextraktion (Kapitel 2.7.3) mit dem DSQ II GC-MS (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt.

2.8.1. Leco Pegasus 4D GC x GC TOF Massenspektrometer

Für die Metabolomanalyse wurde das Leco Pegasus 4D GC x GC TOF MS (Software: ChromaTOF 4.24) im GC-EI-TOF-Modus verwendet. Der Gaschromatograph Agilent GC 7890 (Agilent, Santa Clara, USA) war für die Derivatisierung mit einem MPS 2 XL Autosampler (Software: Maestro 1.4.24.2, Gerstel, Mülheim a. d. Ruhr, Deutschland) ausgerüstet. Ein Alkanmix wurde zur Bestimmung des Retentionsindex verwendet, um die Vergleichbarkeit zwischen den Messungen zu gewährleisten. 1 µL der derivatisierten Probe wurde im Splitless-Modus in einen Injektor mit temperaturprogrammierter Verdampfung (PTV) injiziert, welcher mit einem mit silanisierter Glaswolle gefüllten Glasliner (71 x 1 mm, CIS4) ausgestattet war. Nach 0,02 min bei 70 °C wurde die Temperatur des PTV mit 12 °C/min auf 330 °C erhöht und anschließend für 5 min konstant gehalten. Für die Trennung wurde eine Zebron ZB-5MS-Säule (30 m, 0,25 mm Durchmesser; Phenomenex, Deutschland) oder eine identische DB5MS (Agilent

Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Der Heliumfluss (mobile Phase) wurde auf 1,2 bzw. 1,8 mL/min eingestellt. Nach 1 min bei 70 °C wurde die Temperatur des Säulenofens mit 10 °C/min auf 330 °C erhöht und anschließend für 5 min konstant gehalten. Die Temperatur der Transferline wurde auf 275 °C und die der Ionenquelle auf 250 °C eingestellt. Die Detektorspannung wurde der aktuellen Performance des Gerätes angepasst, indem zu der Ausgabe des automatischen Tunings 200 V addiert wurden. Die Aufzeichnung der Massen (*Solvent delay*) wurde dem Alter der Säule angepasst, um Lösungsmittelpeaks auszublenden. Das gesamte Massenspektrum wurde von 45 bis 600 m/z mit 8 Scans/min aufgenommen.

2.8.2. DSQ II GC Quadrupol Massenspektrometer

Die Analyse der flüchtigen Metabolite im Überstand wurde am DSQ II 2.0.1 (Thermo Fisher Scientific, Software: Xcalibur 2.0.7) durchgeführt. Der Gaschromatograph Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) war mit einem AI/AS 3000 2.0 Autosampler (Thermo Fisher Scientific) ausgerüstet. Ein Alkanmix wurde zur Bestimmung des Retentionsindex verwendet, um die Vergleichbarkeit zwischen den Messungen zu gewährleisten. 1 µL der extrahierten Probe wurde im Split-Modus (1:15) in einen Injektor mit temperaturprogrammierten Verdampfung (PTV) injiziert, der mit einen Trace 2000 Glasliner (1 x 2.75 x 120 mm) ausgestattet war. Nach 0,2 min bei 40 °C wurde die Temperatur des PTV mit 14 °C/min auf 200 °C erhöht und anschließend für 10 min konstant gehalten. Für die Trennung wurde eine Zebron ZB-WAX-Säule (30 m, 0,25 mm Durchmesser; 1µm Filmdicke; Phenomenex, Deutschland) oder eine identische VF-WAXms (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Der Heliumfluss wurde auf 1,2 mL/min eingestellt. Nach 1 min bei 55 °C wurde die Temperatur des Säulenofens mit 10 °C/min auf 245 °C erhöht. Diese Temperatur wurde für 2 min konstant gehalten. Die Temperatur der Transferline wurde auf 220 °C und die der Ionenquelle auf 250 °C eingestellt. Die Aufzeichnung der Massen (*Solvent delay*) wurde bei 3,5 min gestartet, um Lösungsmittelpeaks auszublenden. Das gesamte Massenspektrum wurde von 20 bis 400 m/z mit 4 Scans/min aufgenommen.

2.8.3. Prozessierung der GC-MS Daten

Die Rohdaten der GC-MS Instrumente wurden im NetCDF-Format (*network common data format*) exportiert und mittels der Software MetaboliteDetector (Hiller et al., 2009) weiter prozessiert. Die Software wurde in der Version 2.2.N-2013-01-15 verwendet, die bis 2013

von Christian Nieke (TU Braunschweig) weiterentwickelt wurde. Die Software führte eine automatische Peakdetektion und eine Dekonvolution durch. Durch die Messung des Alkanmixes als Zeitstandard wurden die Retentionsindizes (RI) automatisch nach Formel (4) bestimmt.

$$RI^T = 100 \left[(y - x) \frac{(\log(t_i) - \log(t_x))}{(\log(t_y) - \log(t_x))} + x \right] \quad (4)$$

RI^T : Retentionsindex bei einem Temperaturgradienten

x: Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, der vor dem Analyten eluiert

y: Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, der nach dem Analyten eluiert

t_i : Retentionszeit des Analyten

t_x : Retentionszeit des Alkans, der vor dem Analyten eluiert

t_y : Retentionszeit des Alkans, der nach dem Analyten eluiert

Die berechneten Retentionsindizes wurden zusätzlich korrigiert, indem sie auf die Retentionszeit des verwendeten internen Standards Ribitol bezogen wurden. Durch den Vergleich der Massenspektren und der Retentionsindizes mit einer institutsinternen Bibliothek wurden die Metabolite automatisch von der Software zugeordnet. Es wurde ein *Cut-off* bei 70 % Übereinstimmung gesetzt. Eine Quantifizierung wurde über ein geeignetes, spezifisch festgelegtes Fragment-Ion für die jeweilige Verbindung durchgeführt. Die Bibliothek enthält auch nicht identifizierte Metabolite, welche reproduzierbar in verschiedenen Stämmen am Institut bestimmt wurden, diese sind durch ein „Unknown“ gekennzeichnet. Nicht identifizierte Metabolite, die aus der Golm Metabolomdatenbank (Hummel et al., 2007) stammen, sind durch ein „NA“ oder ein „D“ gekennzeichnet.

Die Daten wurden manuell überprüft und falls nötig wurden nicht erkannte Metabolite hinzugefügt oder nicht ermittelte Peakflächen aufgefüllt. Die Daten wurden auf die Peakfläche des internen Standards Ribitol normiert und die verschiedenen Derivate eines Metaboliten mit dem institutsinternen Skript *itool* summiert.

Für einige Analysen wurden relative Änderungen (*Fold Changes*) durch den Bezug des Wertes der Testbedingung auf den Wert der Referenzbedingung ermittelt. Die Fehler der relativen Änderungen (FC) wurden über die Fehlerfortpflanzung (5) bestimmt.

$$SE_{FC} = \sqrt{\left(\frac{SE_t}{MV_t}\right)^2 + \left(\frac{SE_r}{MV_r}\right)^2} * \frac{MV_t}{MV_r} \quad (5)$$

SE: Standardfehler

MV: Mittelwert

t: Testbedingung

r: Referenzbedingung

2.9. Analyse von Coenzym A-Derivaten

2.9.1. Extraktion von Coenzym A-Derivaten

Das in 1 mL Methanol gelöste Zellpellet (7 mg BTM/mL) wurde in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 600 mg Glaskugeln (70 – 110 µm Durchmesser) vermischt. Die Zellyse wurde in drei Zyklen von 1 min und 30 Hz mit einer Schwingmühe MM400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) in bei – 80 °C vorgekühlten Mahlbechern durchgeführt. Anschließend wurde das gesamte Lysat in 10 mL eisgekühltem Ammoniumacetat (25 mM, pH 6) aufgenommen und die Feststoffe mittels Zentrifugation (10.000 rpm, 5 min, 4 °C) abgetrennt.

Für die Festphasenextraktion wurden Strata XL-AW-Säulen (1 mL Säulenvolumen; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) nacheinander mit 1 mL Methanol, 1 mL Methanol/ddH₂O/Ameisensäure (50:45:5, v/v) und 1 mL ddH₂O konditioniert. Nachdem das flüssige Zelllysate unter Vakuum (800 – 900 mbar) auf die Säule geladen wurde, wurden die Säulen nacheinander mit 1 mL Ammoniumacetat (25 mM) und 1 mL Methanol gewaschen und anschließend für 5 min bei 700 mbar getrocknet. Die Elution erfolgte in zwei Schritten mit 500 µL Methanol mit 0,5 % Ammoniak. Die Proben wurden in einem Vakuumkonzentrator bei 4 °C eingetrocknet und bis zur Messung bei – 80 °C gelagert.

2.9.2. Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie

Die extrahierten Proben wurden für die Messung in 110 µL Probenpuffer aufgenommen und in HPLC-Vials überführt. Die Analyse wurde an einer Dionex Ultimate 3000 LC (Thermo Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) gekoppelt mit einem Bruker MicroTOF QII Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) mit einer Elektrospray-Ionisation (ESI) durchgeführt. 50 µL der Probe wurden ins System injiziert und über eine analytische Säule mit einer C18-Phase (Gemini 150 x 2,0 mm, 3 µm Partikelgröße, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) basierend auf dem Protokoll

von Peyraud et al. (2009) bei 35 °C und einer Flussrate von 220 µL min⁻¹ getrennt. Die Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 0 – 1 min isokratisch bei 5 % B, 1 – 19 min Anstieg auf 30 % B, 19 – 26 min Anstieg auf 95 % B, 26 – 30 min isokratisch bei 95 % B und anschließender Reäquilibration der Säule über 15 min. Die MS-Analyse wurde im positiven ESI-Modus mit einer Rate von 3 Hz für die Datenerfassung und einer automatischen MS/MS-Erfassung durchgeführt. Der Massenbereich wurde auf m/z 90 - 1178 mit einem Endplattenversatz von -500 V und einer Kapillarspannung von 4500 V eingestellt. Der Gasdruck zur Vernebelung lag bei 1,2 bar, das Volumen des Trocknungsgases lag bei 8 L/min und die Trocknungstemperatur wurde auf 200 °C eingestellt.

2.9.3. Prozessierung der LC-MS Daten

Die Rohdaten wurden über das Natriumformiat-Cluster kalibriert und mit einem automatischen Skript der DataAnalysis Software (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) als MZXML-Datei exportiert. Die Peakerkennung und ein Retentionszeitabgleich wurden mit dem R-Skript XCMS durchgeführt. Die CoA-Derivate wurden durch den Vergleich der akkuraten Massen und Retentionszeiten mit einer vorhandenen definierten Bibliothek, in der die Daten von kommerziell erhältlichen Standards hinterlegt sind, durchgeführt.

2.10. Bestimmung von Aminosäuren mittels HPLC-FLD

2.10.1. Probenvorbereitung

Um das Ammonium in den Proben auszufällen, wurden 100 µL zellfreier Überstand mit 100 µL 0,25 M Natriumtetraphenylborat versetzt. Nach 5 min kräftigem Mixen (2.000 rpm) wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm). Wenn nötig, wurde der partikelfreie Überstand vor der Analyse mit ddH₂O verdünnt.

2.10.2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – Fluoreszenzdetektor

Die Aminosäuren wurden mit einem 1260 Infinity HPLC System mit Fluoreszenzdetektor (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit einer Poroshell HPH-C18 Säule (4,6 x 100 mm, Partikelgröße 2,7 µm, Agilent Technologies, Deutschland), quantifiziert. Eine Derivatisierung mit OPA und FMOC wurde online in der Probenschleife durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µL Boratpuffer mit 1 µL Probe und 0,1 µL internem Standard (Norvalin und Sarcosin) versetzt und mit 0,5 µL OPA inkubiert. Anschließend wurde mit 0,4 µL FMOC inkubiert. Um die Derivatisierung zu stoppen,

wurden 32 µL Injektionsdiluent zugesetzt und nach dem Mischen 20 µL der Lösung injiziert. Die Trennung wurde bei 25 °C mit einem Fluss von 1,5 mL/min durchgeführt. Eluiert wurde mit einem Gradienten (Tab. 7) der mobilen Phasen A (25 mM Natriumacetat) und B (Acetonitril). Die Fluoreszenz der OPA-Derivate wurde bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emission von 450 nm gemessen. Nach der Elution von Lysin wurden die Wellenlängen für die Messung der FMOC-Derivate auf 266 nm für die Anregung und 305 nm für die Emission umgestellt.

Tab. 7: Gradientenverlauf der Eluenten A (25 mM Natriumacetat) und B (Acetonitril) der HPLC-Messung zur Quantifizierung der Aminosäuren

Zeit [min]	% A	% B
0,00	97	3
5,30	97	3
5,35	96	4
10,00	93	7
12,00	85	15
22,00	85	15
22,50	75	25
24,50	75	25
27,00	70	30
27,10	0	100
30,00	0	100

2.11. Probenahme und ELISA zur Toxinquantifizierung

Für die extrazelluläre Toxinquantifizierung wurden frische Überstandsproben nach Abzentrifugieren des Zellpellets steril filtriert und bis zur Analyse für maximal 5 Tage bei 4 °C gelagert. In den extrazellulären Proben aus 48 h Kultivierungen wurde Toxin A 1:10 – 1:20 verdünnt, Toxin B wurde unverdünnt bestimmt.

Die Extraktion der intrazellulären Toxine wurde aus Zellpellets aus 20 mL Kultur durchgeführt, die durch Zentrifugation anaerob geerntet wurden (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Nach Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet mit 5 mL anaerobem PBS (4 °C) gewaschen. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Extraktion bei – 80 °C gelagert.

Für die Extraktion wurden die Pellets in 800 µL Dilutionspuffer (aus ELISA-Kit) aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 600 mg Glaskugeln (70 – 110 µm

Durchmesser) überführt. Die Proben wurden kräftig gemischt und anschließend wurde sofort die Zellyse in drei Zyklen von 2 min und 30 Hz mit einer Schwingmühle MM400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) in bei -80°C vorgekühlten Mahlbechern durchgeführt. Da der Dilutionspuffer in den Mühlbechern gefriert, muss hier sehr schnell gearbeitet werden, damit eine Durchmischung der Probe mit den Glaskugeln stattfindet. Die Proben wurden aufgetaut und der Mahlvorgang wurde weitere 2-mal durchgeführt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation abgetrennt (13.000 rpm, 5 min, 4°C) und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Quantifizierung von Toxin A und B wurde mittels eines ELISA (tgcBiomics, Bingen, Deutschland) nach Herstellerangaben mit dem 2-Schritt-Protokoll durchgeführt.

2.12. Probenahme und ATP-Bestimmung mittels Enzmykit

Für die ATP-Bestimmung wurden die Kulturen zu den verschiedenen Zeitpunkten anaerob geerntet. Dafür wurden die Kulturen ins Anaerobzelt eingeschleust und 75 μL der Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden sofort ausgeschleust und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert. Im Kapitel 3.2.1 wurden die Proben zu $\frac{1}{2}$ OD_{max} , und anschließend nach 2, 4, 6 und 8 h für die Kultur in Caseinhydrolysat-Medium geerntet. Die Kultur in Caseinhydrolysat-Medium supplementiert mit 2 g/L Glucose wurde zu $\frac{1}{2}$ OD_{max} und nach 3, 6, 9 und 12 h geerntet. Im Kapitel 3.2.2 wurden die Proben in beiden Medien zu $\frac{1}{2}$ OD_{max} und nach 2, 4, 6 und 8 h geerntet.

Für die Quantifizierung des ATP wurde der BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Die Bestimmung wurde nach den Angaben des Herstellers mit folgenden Änderungen durchgeführt: 75 μL der Enzymlösung wurden direkt auf die gefrorene Kultur gegeben. Anschließend ist die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Lösung wurde kräftig gemischt und 100 μL wurden in eine weiße Mikrotiterplatte überführt (Lumitrac 600, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich). Es wurden jeweils nur maximal 16 Messungen gleichzeitig durchgeführt, um den zeitlichen Fehler zu minimieren. Die ATP-Konzentration wurde anhand einer externen Kalibrierreihe bestimmt (0,001 – 1 μM). Die Lumineszenz wurde mit einem Tecan Infinite® M200 (Tecan i-control 3.7.3.0, Tecan Group, Männedorf, Schweiz) im Abstand von 2,5 Minuten bestimmt, bis kein weiterer Anstieg der Lumineszenz detektiert wurde.

2.13. Probenahme und NAD⁺/NADH-Bestimmung mittels kolorimetrischem Test

Für die Bestimmung des NAD⁺ und NADH wurden Zellpellets aus 20 mL Kultur anaerob mittels Zentrifugation geerntet (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 1 mL anaeroben PBS (4 °C) resuspendiert. Die Lösung wurde in Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zum Aufschluss wurden die Pellets bei – 80 °C gelagert.

Das Pellet wurde in 600 µL Extraktionspuffer (aus Enzymkit) aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 400 mg Glaskugeln (70 – 110 µm Durchmesser) und 300 µL Chloroform überführt. Nach kurzem kräftigem Mischen, um Proteine zu denaturieren, wurden die Zellyse in drei Zyklen von 2 min und 30 Hz mit einer Schwingmühle MM400 (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) in bei – 80 °C vorgekühlten Mahlbechern durchgeführt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation abgetrennt (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Reinigungsschritt durch Zentrifugation wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur Quantifizierung wurde das NAD⁺/NADH Quantification Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde eine Kalibrierreihe zwischen 0,4 und 5 µM verwendet.

2.14. Transkriptomanalyse

Die Aufarbeitung der RNA und die Bestimmung der Genexpression der Kapitel 3.2.1, 3.2.2 und 3.3 wurden durch Kooperationspartner der AG Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig durchgeführt. Für die Analyse der Transkripte wurden Mikroarrays fürs gesamte Genom (*whole-genome microarray*) verwendet, die mit der eArray-Plattform (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) basierend auf der publizierten überarbeiteten Genomsequenz von *C. difficile* 630Δ*erm erm* (Sebahia et al., 2006; Dannheim et al., 2017a) konstruiert wurden (Hofmann et al., 2018). Im Kapitel 3.2.1 wurden die Daten der Kultivierung mit 2 g/L Glucose auf Daten aus Kultivierungen ohne Zusatz bezogen. Im Kapitel 3.2.2 wurden die Daten von Kultivierungen mit 0,5 g/L L-Lactat auf Daten aus Kultivierungen ohne Zusatz bezogen. In Kapitel 3.3 wurden die Daten aus der transienten und der stationären Phase auf Daten aus der exponentiellen Phase bezogen. Details zu den Methoden und Ergebnisse des Kapitels 3.3 sind in der

entsprechenden gemeinsamen Publikation enthalten (Hofmann et al., 2018). Ein Gen wurde als unterschiedlich exprimiert betrachtet, wenn der p -Wert $< 0,05$ und der \log_2 Fold Change (FC) ≤ -1 bzw. ≥ 1 war.

2.15. Proteomanalyse

Die Proteomanalyse im Kapitel 3.3 wurde von Kooperationspartnern der AG Becher (AG Becher, Institut für mikrobielle Proteomik, Uni Greifswald) durchgeführt. Die Analyse der cytosolischen Proteine, der Membranproteine und der extrazellulären Proteine wurde mittels LC-MS/MS durchgeführt. Die Quantifizierung und die Identifikation der Proteinsequenzen erfolgte durch MaxQuant (version 1.5.3.30) (Cox und Mann, 2008) gegen die Fasta-Sequenzen des Genoms von *C. difficile* 630 Δ erm (Dannheim et al., 2017a). Details zu den Methoden und Ergebnissen sind in der entsprechenden gemeinsamen Publikation enthalten (Hofmann et al., 2018).

2.16. Statistische Datenanalyse und Visualisierung

Eine Herausforderung der Metabolomanalyse ist die Gewährleistung reproduzierbarer Probenahmeverfahren in sehr kurzer Zeit. Zusätzlich werden im Vergleich zu z.B. Transkriptomanalysen große Kulturvolumina benötigt, wodurch die Anzahl der Probenreplikate beschränkt wird. Dadurch sind die erhaltenen Datensätze oft nicht normalverteilt, was mittels eines Shapiro-Wilk-Tests (Shapiro und Wilk, 1965) bestätigt wurde. Für die statistische Analyse eignen sich in diesem Fall nicht-parametrische Tests. In dieser Arbeit wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zur Überprüfung der Signifikanz zwischen verschiedenen Bedingungen verwendet. Der p -Wert wurde auf 0,05 festgelegt. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wie sie bei kleinen Stichprobenumfängen üblich sind, wurde eine sogenannte Korrektur nach Benjamini und Hochberg (Benjamini und Hochberg, 1995) angewendet. Die statistischen Tests wurden mit dem MultiExperiment Viewer 4 (MeV4) durchgeführt (Saeed et al., 2003).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Screening auf Nährstoffe, die die Toxin A-Produktion in *C. difficile* 630 Δ *erm* beeinflussen

Um den Einfluss auf die Toxinproduktion zu analysieren, wurden dem Caseinhydrolysat-Medium verschiedene Substrate zugesetzt. Hierbei wurden vor allem Substanzen gewählt, die eine wichtige Rolle in der westeuropäischen Ernährung spielen, und so einen Einfluss auf eine Infektion mit *C. difficile* haben könnten. Daraus sollten Erkenntnisse gewonnen werden, welche Substanzen einen reduzierenden Effekt auf die Toxinproduktion haben, um durch Metabolomanalysen von *C. difficile* 630 Δ *erm* nach Kultivierung mit diesen Substanzen Rückschlüsse auf die Regulierung der Toxinproduktion ziehen zu können. Des Weiteren könnten darauf basierende Ernährungsanpassungen bei einer Infektion mit *C. difficile* die Symptomatik lindern, wenn die Toxinproduktion eingeschränkt wird.

Betrachtet wurden einige Substanzen aus den energieliefernden Nahrungsgruppen der Kohlenhydrate und Proteine. Darüber hinaus wurden Zuckeraustauschstoffe, Süßstoffe und Glycerin, als Vertreter der Zusatzstoffe, untersucht. Im Bereich der Kohlenhydrate wurden die Einfachzucker Glucose (2, 5 und 10 g/L) sowie Fructose, Mannose und Xylose (2 g/L) eingesetzt. Glucose und Fructose sind die am häufigsten vorkommenden Einfachzucker in der menschlichen Ernährung, da auch der normale Haushaltszucker Saccharose aus diesen beiden Untereinheiten besteht (Schormüller, 2008). Mannose kommt häufig als Untereinheit in pflanzlichen Polysacchariden vor, ist aber auch Bestandteil eines Oligosaccharids im Eigelb (Rezek et al., 1978; Ohta et al., 1991). Xylose, ein Bestandteil der Hemicellulosen, kommt in heimischen Laub- und Nadelholzarten vor. Da es im menschlichen Stoffwechsel praktisch nicht abgebaut wird (Schormüller, 2008), wäre es eine einfache Möglichkeit Einfluss auf den Stoffwechsel von *C. difficile* im Darm zu nehmen. Im Bereich der Disaccharide wurden Lactose, Lactulose und Trehalose verwendet. Der Milchzucker Lactose ist ein natürlicher Bestandteil der westeuropäischen Ernährung. Lactulose ist ein synthetisch hergestelltes Isomer der Lactose, das unter anderem als Präbiotikum eingesetzt wird, wobei es durch die Absenkung des pH-Wertes das Wachstum bestimmter pathogener Keime reduziert (Clausen und Mortensen, 1997; Bezkorovainy, 2001). Trehalose wird als Zuckeraustauschstoff in der menschlichen Ernährung genutzt. Dieses Disaccharid wurde vor kurzem als ein möglicher Grund für

die Ausbreitung hypervirulenter *C. difficile* Stämme identifiziert (Collins et al., 2018). Der acetylierte Zucker N-Acetylglucosamin ist ein wesentlicher Teil der bakteriellen Zellwand, kommt im menschlichen Körper aber auch in der Gelenkflüssigkeit und in Erythrozyten vor (Siegenthaler und Altmeyer, 2001; Elias, 2009). Aus dem Bereich der Zuckeralkohole wurden Mannitol, Xylitol, meso-Inosit und Glycerin untersucht. Mannitol und Xylitol sind zugelassene Zuckeraustauschstoffe. Mannitol kann vom menschlichen Organismus nicht metabolisiert werden. Xylitol hat einen geringeren Einfluss auf den Blutzuckerspiegel als Glucose, weshalb es häufig von Menschen mit Diabetes als Ersatz für Saccharose verwendet wird. Außerdem wurde für Xylitol eine antikariogene Wirkung nachgewiesen, weshalb es oft in Kaugummi und Zahnpasta verwendet wird (Rosenplenter et al., 2007; Schormüller, 2008). Meso-Inosit wird vom menschlichen Organismus aus Glucose hergestellt und ist in vielen Geweben vorhanden. Auf Mikroorganismen wirkt es wachstumsfördernd (Steinegger und Hänsel, 1988). Glycerin ist Bestandteil natürlicher Fette und Öle. Außerdem wird es als Lebensmittelzusatzstoff zum Feuchthalten oder als Süßungsmittel (Baltes und Matissek, 2011). Aus dem Bereich der Polysaccharide wurden Inulin und Pektin eingesetzt. Beide sind Bestandteil verschiedener Gemüse- oder Obstsorten. Inulin wird, ähnlich wie Xylitol, als Stärkeersatz für Menschen mit Diabetes mellitus eingesetzt (Dehghan et al., 2013). Pektin wird als Geliermittel u. a. in Fruchtgummi und Marmeladen verwendet (Baltes und Matissek, 2011). Alle Zucker und Zuckerderivate wurden C-Äquivalent zu 2 g/L Glucose eingesetzt. Die Süßstoffe Acesulfam K, Aspartam, Cyclamat und Saccharin wurden in einer Konzentration von 250 mg/L eingesetzt, dabei handelt es sich um eine Konzentration, die für die Aufnahme durch Diät-Limonaden charakteristisch ist (Leclercq et al., 1999; Zhu et al., 2005; Rosenplenter et al., 2007). Bei den Aminosäuren wurden Arginin, Cystein, Glycin, Histidin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin und Serin zusätzlich zu 2 g/L Glucose C-äquivalent eingesetzt. Eine proteinreiche Ernährung ist heutzutage eine sehr beliebte Form der Diät und wird häufig in der Sportlerernährung zum Muskelaufbau verwendet (Kaplan et al., 2000; Turner und Thompson, 2013).

3.1.1. Wachstumsverhalten von *C. difficile* 630 Δ erm mit verschiedenen Substraten

Das Wachstumsverhalten von *C. difficile* 630 Δ erm wurde in Caseinhydrolysat-Medium, supplementiert mit den einzelnen Substanzen, untersucht. Dadurch konnten die

verschiedenen Substrate bereits in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bildeten die Zucker und Zuckerderivate, die von *C. difficile* 630 Δ erm umgesetzt werden und deren Kulturen eine ähnliche maximale optische Dichte erreichten wie die Kulturen mit 2 g/L Glucose (Abb. 9 A). Dabei handelte es sich um Fructose, Mannose, Mannitol und N-Acetylglucosamin. Die höheren Konzentrationen an Glucose (5 und 10 g/L) im Medium führten zu keiner Erhöhung der maximalen optischen Dichte der Kulturen. Eine zweite Gruppe bildeten Trehalose und Pektin. Mit diesen Substanzen im Medium zeigten die Kulturen eine maximale optische Dichte, die zwischen den Kulturen ohne Glucose und denen mit 2 g/L Glucose im Medium lag (Abb. 9 B). Bei der dritten Gruppe handelte es sich um Stoffe, die keinen Einfluss auf die maximale optische Dichte der Kulturen von *C. difficile* 630 Δ erm zeigten (Abb. 9, C und D). In diese Gruppe fielen Xylose und Xylitol, meso-Inosit, Lactose, Lactulose und Inulin.

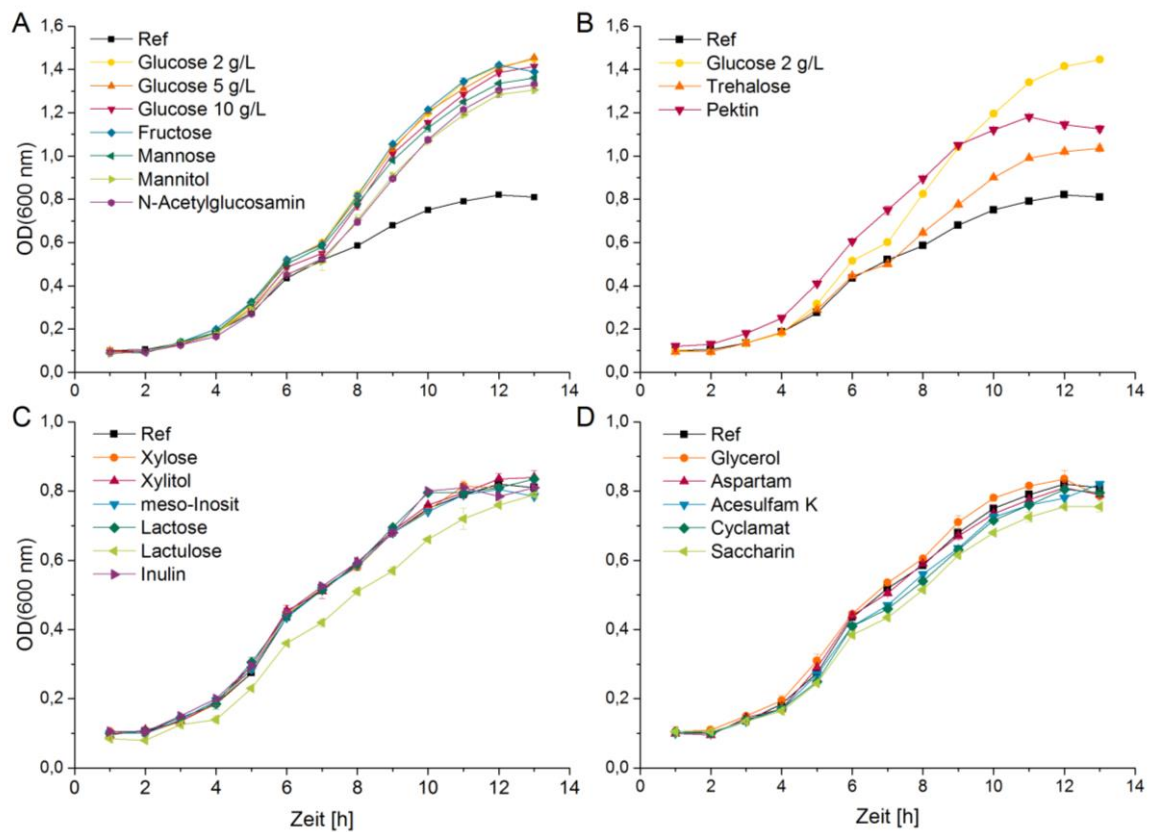


Abb. 9: Wachstum von *C. difficile* 630 Δ erm in Caseinhydrolysat-Medium (Ref) und supplementiert mit den verschiedenen C-äquivalent eingesetzten Zuckern und Zuckerderivaten bzw. 5 g/L und 10 g/L Glucose oder 250 mg/L für die Süßstoffe. A: Substanzen, mit denen *C. difficile* 630 Δ erm eine ähnlich optische Dichte erreicht wie mit 2 g/L Glucose; B: Substanzen mit einer maximalen optischen Dichte zwischen der Referenz und 2 g/L Glucose; C und D: Substanzen, die keinen Einfluss auf die optische Dichte zeigen. Das Wachstum wurde in Hungate-Glasröhrchen mittels eines WPA CO8000 Zelldensitometers in drei unabhängigen Kultivierungen bestimmt.

Auch Glycerin und die vier getesteten Süßstoffe zeigten keinen Einfluss auf das Wachstum. Die verschiedenen Zucker- und Zuckerderivate zeigten kaum Einfluss auf die Wachstumsrate von *C. difficile* 630 Δ erm, sie lag bei allen Substraten zwischen 0,28 und 0,36 h⁻¹ (Tab. 8).

Tab. 8: Maximalen Biotrockenmasse (BTM_{max}) und maximale Wachstumsraten (μ_{\max}) der Kulturen von *C. difficile* 630 Δ erm supplementiert mit verschiedenen Substraten. Kultiviert wurde in Caseinhydrolysat-Medium (Ref) und supplementiert mit den verschiedenen C-äquivalent eingesetzten Zuckern und Zuckerderivaten bzw. 5 g/L und 10 g/L Glucose oder 250 mg/L für die Süßstoffe.

Zusatz	BTM _{max} [g/L]	μ_{\max} [h ⁻¹]	Zusatz	BTM _{max} [g/L]	μ_{\max} [h ⁻¹]
Ohne Zusatz (Ref)	0,23 \pm 0,01	0,36 \pm 0,02	Xylitol	0,24 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02
Glucose 2 g/L	0,43 \pm 0,01	0,35 \pm 0,03	meso-Inosit	0,23 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02
Glucose 5 g/L	0,43 \pm 0,01	0,35 \pm 0,03	Lactose	0,24 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02
Glucose 10 g/L	0,43 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	Lactulose	0,23 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02
Fructose	0,45 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	Inulin	0,23 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02
Mannose	0,41 \pm 0,01	0,33 \pm 0,02	Glycerol	0,24 \pm 0,01	0,30 \pm 0,03
Mannitol	0,40 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02	Aspartam	0,23 \pm 0,01	0,32 \pm 0,03
N-Acetylglucosamin	0,41 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02	Acesulfam K	0,23 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02
Trehalose	0,31 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02	Cyclamat	0,23 \pm 0,01	0,30 \pm 0,02
Pektin	0,35 \pm 0,01	0,33 \pm 0,03	Saccharin	0,22 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02
Xylose	0,24 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02			

Das Wachstumsverhalten bei der Supplementierung mit den Aminosäuren konnte ebenfalls in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Als Referenzkultivierung für das Wachstum wird die mit 2 g/L Glucose supplementierte Kultur verwendet, da Glucose dem Medium ebenfalls zusätzlich zu den Aminosäuren zugesetzt wurde. Die erste Gruppe bildeten Glycin, Histidin, Leucin, Methionin, Phenylalanin und Serin (Abb. 10 A). Die Supplementierung des Mediums mit diesen Aminosäuren führte bei der Kultivierung zu keiner oder einer nur leicht erhöhten maximale optische Dichte im Vergleich zur Referenzkultur. Die zweite Gruppe bildeten Arginin, Cystein und Prolin. Die Kultivierungen mit diesen Aminosäuren zeigten eine reduzierte maximale Biotrockenmasse im Vergleich zur Referenzkultivierung (Abb. 10 B). Auch hier variierten die maximalen Wachstumsraten der Kulturen zwischen den verschiedenen Substraten nicht, nur die Kultur mit Prolin-Supplementierung zeigte eine erhöhte Wachstumsrate von 0,50 \pm 0,02 h⁻¹ (Tab. 9), dafür aber eine verringerte maximale optische Dichte. Die erhöhte Prolinmenge im Medium führte also zu einem schnelleren Wachstum, resultierte

dann aber in einer geringeren Biomasse. Prolin gehört zu den stark favorisierten Aminosäuren von *C. difficile* 630 Δ erm (Neumann-Schaal et al., 2015). Es wird in einer reduktiven Stickland-Reaktion über den Prolin-Reduktase-Komplex (Prd) zu 5-Aminovalerat abgebaut (Seto und Stadtman, 1976; Kabisch et al., 1999), welches dann sekretiert wird. Dabei wird ein Molekül NADH zu NAD⁺ umgesetzt. Bei einer Erhöhung der Prolinmenge im Medium wird die Expression der Gene des Prolin-Reduktase-Komplexes erhöht, es wird aber auch die Transkription der Gene für den Glycin-Reduktase-Komplex, welcher die Reaktion von Glycin zu Acetyl-Phosphat katalysiert, inhibiert (Bouillaut et al., 2013). Acetyl-Phosphat kann zu Acetyl-CoA umgewandelt werden und somit in den Zentralstoffwechsel oder die Biomasseproduktion geleitet werden. Eine Hemmung der Expression des Glycin-Reduktase-Komplexes durch die erhöhte Prolinmenge würde die geringere Biomasseausbeute erklären.

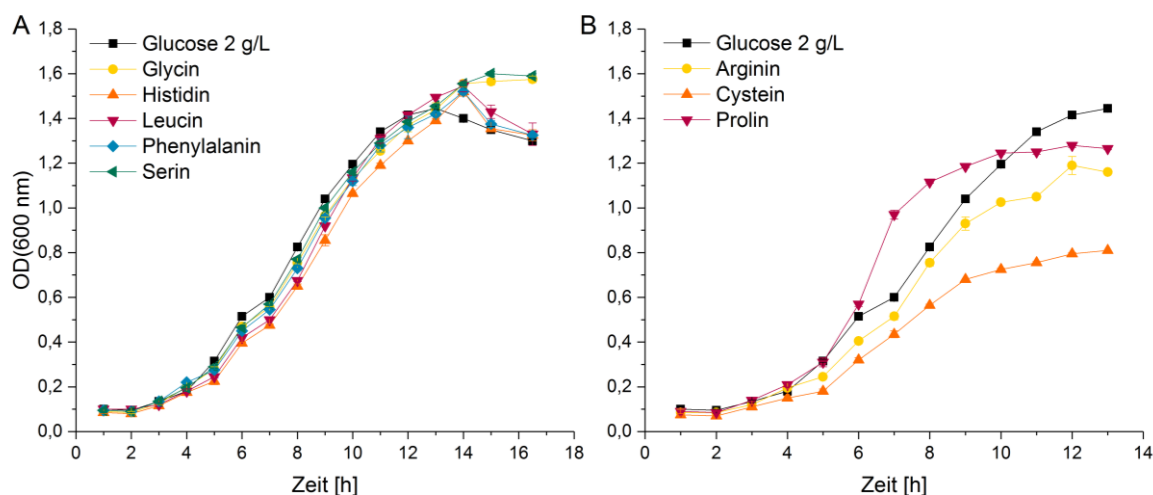


Abb. 10: Wachstum von *C. difficile* 630 Δ erm in Caseinhydrolysat-Medium mit 2 g/L Glucose und supplementiert mit verschiedenen Aminosäuren, die C-Äquivalent zu 2 g/L Glucose eingesetzt wurden. A: Aminosäuren, mit denen *C. difficile* 630 Δ erm eine ähnlich optische Dichte erreicht wie die Referenz; B: Aminosäuren, mit einer reduzierten optische Dichte in der Kultivierung im Vergleich zur Referenz. Das Wachstum wurde in Hungate-Glasröhrchen mittels eines WPA CO8000 Zelldensitometers in drei unabhängigen Kultivierungen bestimmt.

Tab. 9: Maximalen Biotrockenmasse (BTM_{\max}) und maximale Wachstumsraten (μ_{\max}) der Kulturen von *C. difficile* 630 Δ erm supplementiert mit verschiedenen Aminosäuren. Kultiviert wurde in Caseinhydrolysat-Medium mit 2 g/L Glucose und supplementiert mit verschiedenen Aminosäuren, die C-Äquivalent zu 2 g/L Glucose eingesetzt wurden.

Zusatz	BTM_{\max} [g/L]	μ_{\max} [h ⁻¹]	Zusatz	BTM_{\max} [g/L]	μ_{\max} [h ⁻¹]
Glc 2 g/L	$0,43 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,03$	Histidin	$0,45 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$
Arginin	$0,33 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,01$	Leucin	$0,46 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$
Cystein	$0,22 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$	Phenylalanin	$0,45 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,02$
Prolin	$0,35 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,02$	Serin	$0,46 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$
Glycin	$0,46 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$			

3.1.2. Auswirkungen der verschiedenen Substrate auf die Toxinproduktion von *C. difficile* 630 Δ erm

Aus den Überständen der Kulturen mit den verschiedenen Substraten wurde die Konzentration an Toxin A nach 48 h bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die ermittelte Menge auf die maximale Biotrockenmasse bezogen (Abb. 11).

Schon beim Vergleich der drei Glucosekonzentrationen zeigten sich starke Unterschiede in der extrazellulären Konzentration an Toxin A. Im Vergleich zur Kultivierung ohne Zusatz war die extrazelluläre Toxinkonzentration der Kultivierung mit 2 g/L Glucose erhöht, während bei 5 und 10 g/L Glucosezusatz die Toxinkonzentration reduziert war. Die maximale Biotrockenmasse der Kultivierung ohne Zusatz lag bei $0,23 \pm 0,01$ g/L, während sie bei den drei Glucosekonzentrationen (2, 5 und 10 g/L) bei $0,43 \pm 0,01$ g/L lag. Eine erhöhte Glucosekonzentration im Medium führte also nicht zu einem stärkeren Wachstum, aber zu einer geringeren extrazellulären Toxinkonzentration. Die Untersuchung der metabolischen Einflüsse auf diese Unterschiede werden in einem Experiment mit 0, 2 und 10 g/L Glucose im Kapitel 3.2.1 dargestellt.

Von den Kulturen mit zugesetzten Zuckern bzw. Zuckerderivaten, die keinen Einfluss auf die Biomasseproduktion zeigten (Abb. 9, C und D), hatten nur Xylitol und Lactulose einen signifikanten Einfluss auf die extrazelluläre Toxinkonzentration, im Vergleich zu der Kultivierung ohne Zusatz.

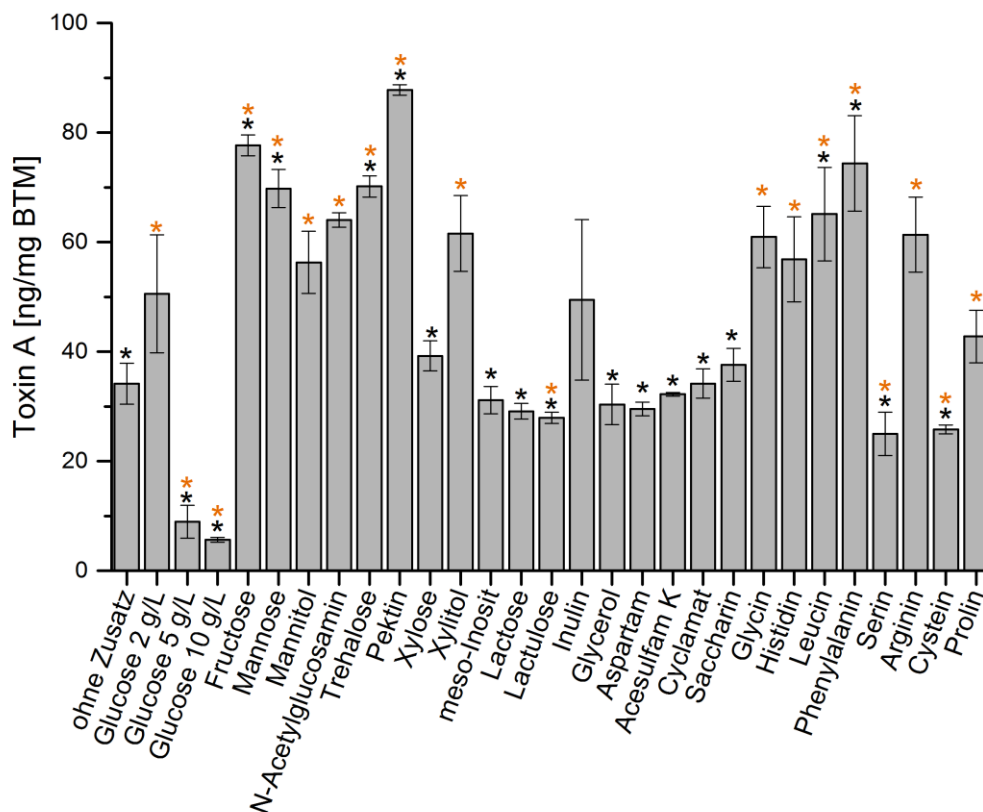


Abb. 11: Extrazelluläre Konzentrationen an Toxin A der Kultivierungen mit verschiedenen Substraten. Die Toxinkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf die maximale Biotrockenmasse bezogen. * Signifikante Änderungen (p -Wert < 0,05) im Vergleich zu 2 g/L Glucose; * signifikante Änderungen (p -Wert < 0,05) im Vergleich zu der Kultivierung ohne Zusatz, bestimmt mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg). Im Anhang A1 sind die einzelnen Werte mit p -Wert angegeben.

Durch die Supplementierung des Mediums mit Lactulose war die Toxinkonzentration im Kulturüberstand nach 48 h um 18 % verringert. Bei einer Xylitolsupplementierung des Mediums zeigten die Kulturen nach 48 h eine um 78 % erhöhte extrazelluläre Toxinkonzentration im Vergleich zu der Toxinkonzentration von Kultivierungen ohne Zusatz. Die erhöhte extrazelluläre Toxinkonzentration könnte verschiedene Ursachen haben. Xylitol zeigte keinen Einfluss auf die maximale Biomasse, was bedeuten könnte, dass *C. difficile* 630 Δ erm nicht in der Lage ist, Xylitol zu metabolisieren. Dies wurde bereits für andere *C. difficile* Stämme bestätigt (Theriot et al., 2014). Xylitol hat einen hemmenden Effekt auf viele grampositive Bakterien, dies ist am besten untersucht für antikariogene Effekte auf Streptokokken (Mäkinen, 1976; Gallagher und Pearce, 1977). Die Wirkung könnte hier auf der Eigenschaft der Moleküle beruhen, die Adhäsionsfähigkeit der Erreger an die Wirtszellen zu verändern (Modesto und Drake,

2006; Badet et al., 2008). Naaber et al. (1996) konnten ebenfalls einen solchen Effekt für *C. difficile* VPI 10463 im Zusammenhang mit Epithelzellen zeigen. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch unbekannt. In Streptokokken beruht die Wirkung vermutlich auf einer Veränderung oder Störung der Biofilmbildung (Modesto und Drake, 2006; Lee et al., 2012). Andere Studien zeigten eine Aufnahme des Xylitols über das Phosphotransferase-System (PTS) und einen Rückgang der Zwischenprodukte der Glykolyse (Miyasawa-Hori et al., 2006; Kakuta et al., 2003). Es wurde vermutet, dass Xylitol-5-Phosphat kein geeignetes Substrat für die Enzyme der Glykolyse ist und dass ein indirekter Effekt durch eine Konkurrenz zwischen Xylitol und Glucose im PTS bestehen könnte (Miyasawa-Hori et al., 2006).

Beide für Xylitol beschriebene Effekte könnten auch für die erhöhte extrazelluläre Toxinkonzentration in der Kultivierung mit Xylose verantwortlich sein. Biofilme von *C. difficile* beinhalten Proteine, DNA und Polysaccharide (Dapa und Unnikrishnan, 2013). Mit Glucose im Medium bildet *C. difficile* 630 Δ erm ein Polysaccharid, das aus acetylierten Glucoseeinheiten besteht (Dannheim et al., 2017b). Durch eine Veränderung des Exopolysaccharids von *C. difficile* 630 Δ erm könnte es zu Veränderungen im Quorum sensing kommen, das wiederum zu einer erhöhten Toxinproduktion führen könnte. Ein Einfluss des Quorum sensing auf die Regulation der Toxingene für *C. difficile* wurde für verschiedene Stämme gezeigt (Darkoh et al., 2015).

Veränderungen im Zuckertransport durch das PTS könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Toxinproduktion in *C. difficile* haben. Zusammenhänge zwischen Virulenz und PTS sind bereits bekannt, welche auf Regulationen durch am PTS beteiligte Proteine beruhen (Deutscher et al., 2006). Ein solcher Zusammenhang könnte auch die Unterschiede in der Toxinproduktion in den Kultivierungen ohne Zusatz und mit den verschiedenen Glucosekonzentrationen erklären.

Kulturen, deren Medium mit Mannose, Fructose, Trehalose und Pektin supplementiert wurden, zeigten signifikant erhöhte Toxinkonzentrationen um bis zu 65 %, im Vergleich zur Kultivierung mit 2 g/L Glucose. Die im Medium mit den Monosacchariden Mannose und Fructose supplementierten Kultivierungen zeigten ebenso eine vergleichbare maximale Biomasse. Mannose und Fructose werden, wie auch Glucose, über eine Phosphotransferase aufgenommen (Saier, 1977; Dannheim et al., 2017a). Mannose-6-phosphat wird über eine Isomerase in Fructose-6-phosphat umgewandelt und in die Glykolyse eingeschleust. Fructose-1-phosphat wird über eine Kinase in Fructose-1,6-bisphosphat umgewandelt und ebenfalls in die Glykolyse eingeschleust. Intrazelluläre

Fructose kann auch über eine Fructokinase zu Fructose-6-phosphat umgewandelt werden (Gunsalus et al., 1955; Dannheim et al., 2017a). Die erhöhte Toxinproduktion könnte aufgrund von unterschiedlichen Phosphotransferase-Enzymen zustande kommen, falls diese einen direkten oder indirekten regulatorischen Effekt auf die Toxinproduktion haben. Eine weitere Möglichkeit könnte ein Unterschied in der Geschwindigkeit der Aufnahme der Zucker sein, wodurch Unterschiede im Stoffwechsel und daraus resultierend in der Toxinproduktion entstehen könnten. Um diese Effekte zu analysieren, wurde *C. difficile* 630 Δ erm in Medium mit Glucose bzw. Mannose bis in die stationäre Phase kultiviert, um den Einfluss der Zuckerart auf den Stoffwechsel und die Toxinproduktion zu untersuchen (Kapitel 3.2.3).

Die maximale Biomasse in den Kultivierungen mit Trehalose und Pektin im Medium war im Vergleich zu Kultivierungen mit Glucose um bis zu 27 % reduziert. Dies spricht für eine weniger effiziente Aufnahme oder Fermentation. Trehalose wird über eine Phosphotransferase aufgenommen und zu Glucose-6-phosphat und Glucose abgebaut (Collins et al., 2018). Eine verringerte Fermentation von Trehalose wurde in verschiedenen *C. difficile* Stämmen nachgewiesen (Nakamura et al., 1982). Die erhöhte Toxinproduktion mit Trehalose und dem Polysaccharid Pektin resultiert daher vermutlich auf Regulationen aufgrund unterschiedlicher Aufnahmeraten und einem daraus resultierenden veränderten Zuckerstoffwechsel.

Auch die Erhöhung verschiedener Aminosäure-Konzentrationen im Medium (zusätzlich zum Caseinhydrolysat und 2 g/L Glucose) führte zu starken Unterschieden in der extrazellulären Toxinkonzentration der entsprechenden Kulturen. Im Vergleich zu der Toxinkonzentration der Kultur mit 2 g/L Glucose, führte die Zugabe von Cystein und Serin zu einer Reduktion der extrazellulären Toxinkonzentration um bis zu 52 %, während die Zugabe von Phenylalanin und Leucin zu einer um bis zu 41 % erhöhten extrazellulären Toxinkonzentration führte. Die Supplementierung mit Glycin, Arginin, und Histidin führte zu keinen signifikanten Konzentrationsunterschieden des Toxins im Kulturüberstand. Cystein und Serin werden beide über Acetyl-CoA in den Zentralstoffwechsel eingeschleust und für den Aufbau von Biomasse verwendet (Fonknechten et al., 2010). Leucin gehört neben Prolin zu den von *C. difficile* 630 Δ erm am schnellsten über Stickland-Reaktionen verwerteten Aminosäuren (Neumann-Schaal et al., 2015). Leucin und Phenylalanin sind die einzigen Aminosäuren, die sowohl über eine reduktive, als auch eine oxidative Stickland-Reaktion abgebaut werden. Glycin und Prolin werden über modifizierte reduktive Stickland-Reaktionen abgebaut. Arginin kann

über Citrullin abgebaut werden und für Histidin ist eine Stickland-Reaktion mit 4-Imidazolacetat als Produkt bekannt. Beide Abbauwege sind für *C. difficile* 630 Δ erm annotiert (Dannheim et al., 2017a), scheinen aber unter den spezifischen Bedingungen nicht abzulaufen (Neumann-Schaal et al., 2015; Hofmann et al., 2018). Mit dem Zentralstoffwechsel assoziierte Aminosäuren (Cystein und Serin) scheinen einen größeren Effekt auf die Toxinproduktion auszuüben, als solche, die über Stickland-Reaktionen verwertet werden. Die Supplementierung mit Cystein führte außerdem zu einer Reduzierung der Biomasse, daher wurde es für eine zeitaufgelöste Analyse des Stoffwechsels ausgewählt (Kapitel 3.4).

Zusammengefasst konnte in vielen der Kultivierungen, die mit Zuckern versetzt waren, die einen Einfluss auf die Biomasse hatten, eine erhöhte extrazelluläre Toxinkonzentration nachgewiesen werden. Stark reduzierte extrazelluläre Toxinkonzentrationen wurden in den Kultivierungen mit erhöhten Glucosekonzentrationen und Serin- oder Cysteinsupplementierung bestimmt. Aufgrund der hohen Resorptionsfähigkeit von Glucose und freien Aminosäuren im menschlichen Darm (Ganong und Auerswald, 1972) wird sich eine erhöhte Zuführung dieser Substanzen über die Ernährung vermutlich nicht positiv auf eine Infektion mit *C. difficile* auswirken. Die zugrunde liegenden Wirkmechanismen im Metabolom könnten jedoch Angriffspunkte für Therapeutika aufzeigen, weshalb in den folgenden Kapiteln der Zusammenhang zwischen Metabolom und Toxinproduktion näher diskutiert wird.

3.2. Analyse des Einflusses verschiedener Substrate auf den Stoffwechsel und die Toxinproduktion

In diesem Kapitel wird der Einfluss verschiedener Substrate auf die Toxinproduktion untersucht. Es soll gezeigt werden, wie sich die unterschiedlichen Substrate bzw. verschiedene Substratkonzentrationen im Medium auf den Stoffwechsel auswirken und welcher Zusammenhang zur Toxinproduktion besteht.

3.2.1. Glucosekonzentration beeinflusst die Toxinproduktion gegensätzlich in Abhängigkeit von der Konzentration im Medium

Eine hohe Glucose-Konzentration im Caseinhydrolysat-Medium führte zu einer starken Reduzierung der extrazellulären Toxinkonzentration, während durch eine moderate Glucosekonzentration im Medium die extrazelluläre Toxinkonzentration erhöht wurde (Abb. 12 A & B).

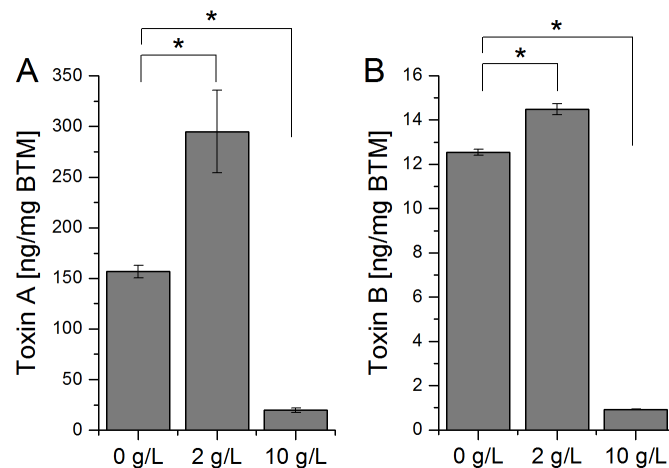


Abb. 12: Extrazelluläre Toxinkonzentration von *C. difficile* 630 Δ erm kultiviert mit verschiedenen Glucosekonzentrationen. Toxin A (A) und B (B) wurden nach 48 h im Überstand von Kulturen aus Caseinhydrolysat-Medium ohne Glucose und supplementiert mit 2 und 10 g/L Glucose mittels ELISA bestimmt und auf die Biotrockenmasse bezogen. * signifikante Änderung mit p -Wert < 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg.

Die Hintergründe im Stoffwechsel und der Regulation, auf der diese Diskrepanz beruht, ist bis dato unklar. Auch das Wachstum wird durch die Glucosekonzentration im Medium unterschiedlich beeinflusst (Abb. 13 A). Während eine moderate Glucosekonzentration (2 g/L, CDMM) zu einer höheren maximalen Biomasse führte, war durch eine hohe Glucosekonzentration (10 g/L) kein weiterer Anstieg nachweisbar. Dagegen führte eine moderate Glucosekonzentration zu einer Zellaggregation (Abb. 13 B) und einem dadurch bedingten Abfall der optischen Dichte, sobald die Kultur in die stationäre Phase überging. Bei Kultivierungen ohne Glucose war die Zellaggregation langsamer und bei Kultivierungen mit 10 g/L Glucose im Medium war kein Abfall der optischen Dichte in der stationären Phase nachweisbar.

Um die zugrunde liegenden Veränderungen im Stoffwechsel und in der Genexpression nachzuvollziehen, wurde *C. difficile* 630 Δ erm in Caseinhydrolysat-Medium ohne Glucose und supplementiert mit 2 g/L und 10 g/L Glucose in der exponentiellen und zu Beginn der stationären Phase geerntet. Die Metabolom- und Exometabolomdaten (Anhang A2-A4) der einzelnen Zeitpunkte wurden miteinander verglichen. Für eine Transkriptomanalyse von Zellen, die ohne Glucose und mit 2 g/L Glucose kultiviert wurden, wurde die RNA-Extraktion und die Messung der DNA-Microarrays von Annika-Marisa Michel (AG Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) durchgeführt. Die Analyse der Transkriptomdaten erfolgte eigenständig.

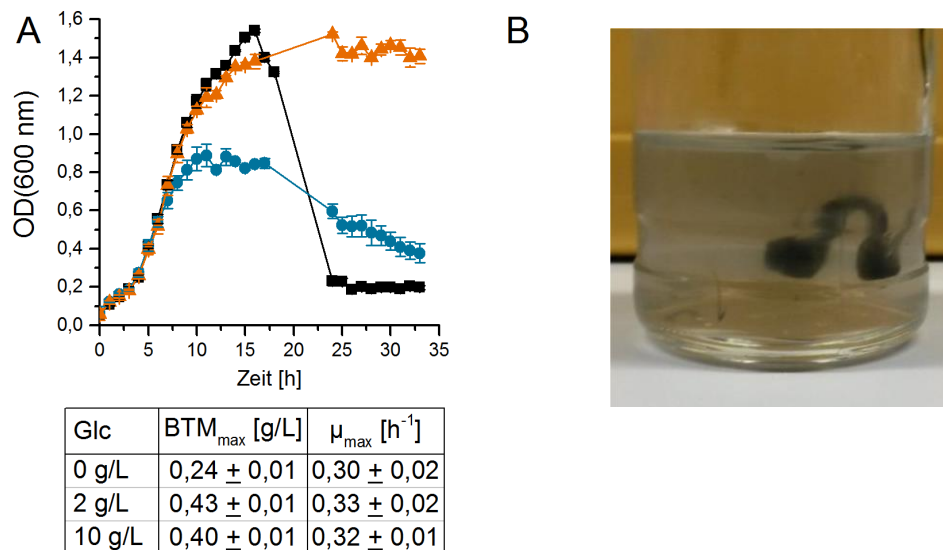


Abb. 13: Wachstum von *C. difficile* 630Δ*erm* kultiviert mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (A) und beobachtete Zellaggregation in der stationären Phase mit 2 g/L Glucose im Medium. A: Das Wachstum, die entsprechende maximale Biotrockenmasse (BTM_{max}) und die maximale Wachstumsrate (μ_{max}) wurden in drei unabhängigen Kultivierungen in Hungates bestimmt: blau: 0 g/L Glc, schwarz: 2 g/L Glc, orange: 10 g/L Glc. B: Foto einer Kultur von *C. difficile* 630Δ*erm* in CDMM nach 48 h.

3.2.1.1. Änderung im Stoffwechsel in Kultivierungen mit verschiedenen Glucosekonzentrationen

Im Vergleich des Stoffwechsels zwischen Metabolomproben aus Kultivierungen ohne Glucose und mit einer Supplementierung von 2 und 10 g/L Glucose im Medium, die in der exponentiellen bzw. zu Beginn der stationären Wachstumsphase geerntet wurden, zeigten sich Unterschiede in den Stickland-Reaktionen und im Zentralstoffwechsel. Die Aminosäureaufnahme der in den Stickland-Reaktionen verwerteten Aminosäuren war mit steigender Glucosekonzentration reduziert. Ausnahmen bildeten Prolin, welches in allen drei Kultivierungen bereits in der exponentiellen Phase vollständig aufgenommen worden war, und Alanin, welches in der Kultivierung in Caseinhydrolysat-Medium aufgenommen wurde, bei einer Supplementierung mit Glucose im Medium aber keine Aufnahme mehr zeigte (Abb. 14). Die entsprechenden Produkte wurden, passend zu der Aufnahme der Aminosäuren, in den Kultivierungen mit steigender Glucosekonzentration im Medium in geringeren Konzentrationen im Überstand nachgewiesen. Ausnahmen bildeten hier Acetat, das mit steigender Glucosekonzentration im Medium in der stationären Phase eine leicht erhöhte Konzentration im Überstand zeigte, und Isocaproat, das in allen drei Kultivierungen in ähnlichen extrazellulären Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Abb. 14).

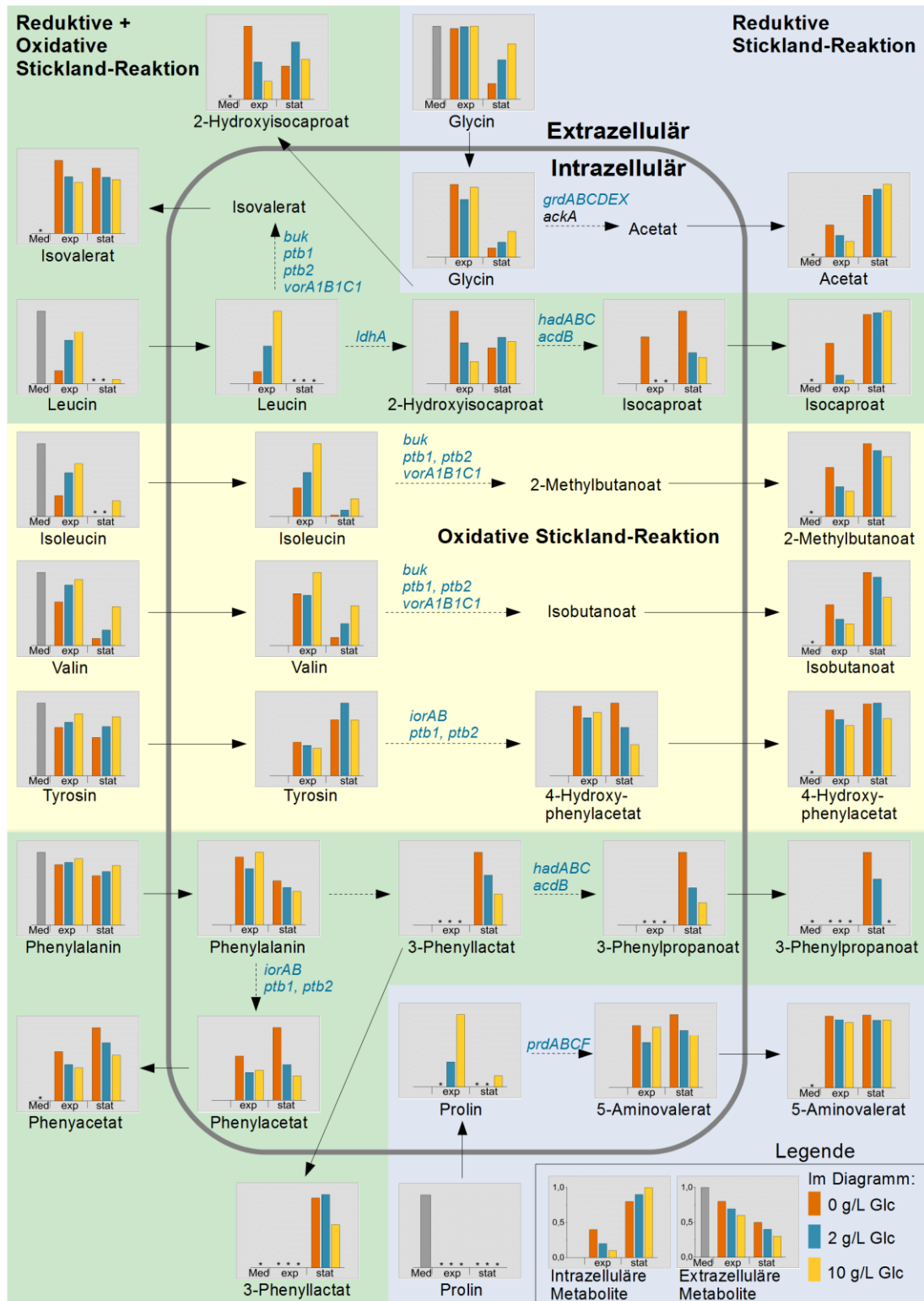


Abb. 14: Aminosäureabbau in *C. difficile* 630Δ*erm* kultiviert mit verschiedenen Glucosekonzentrationen. Angegeben sind die relativen Werte bezogen auf die höchste Konzentration/Peakfläche der intrazellulär und extrazellulär nachgewiesenen Metabolite im Medium (Med, grau), der exponentiellen (exp) und der stationären Phase (stat) aus Kultivierungen in Caseinhydrolysat-Medium. Die Gene geben die Expressionsunterschiede in der stationären Phase der Proben aus der Kultivierung mit 2 g/L Glucose gegen die ohne Glucose kultivierten Proben wieder: blau: $\log_2 \text{FC} \leq -1$, p -Wert < 0,05, bestimmt mittels eines DNA-Microarrays. * nicht nachgewiesen.

Die Aufnahme der im Zentralstoffwechsel verwerteten Aminosäuren Cystein, Serin und Threonin nahm ebenfalls mit steigender Glucosekonzentration im Medium ab. Glucose war in beiden Kultivierungen mit Glucosesupplementierung im Medium zum stationären Zeitpunkt nicht vollständig aufgenommen worden (Abb. 15). In der Kultivierung mit 2 g/L Glucose im Medium wurden bis zur stationären Phase $1,6 \pm 0,1$ g/L Glucose verbraucht. In den Proben der Kultivierung mit 10 g/L Glucose waren es $2,1 \pm 0,2$ g/L, bezogen auf die bestimmten Peakflächen.

Unter der Annahme, dass die aufgenommene Glucose, Serin, Threonin und Cystein vollständig für den Aufbau von Biomasse verwendet werden, und unter Berücksichtigung des aufgenommenen Alanins in der Kultivierung ohne Glucose, steht im Medium mit 2 g/L Glucose circa die 1,9-fache Menge an Kohlenstoff für den Biomasseaufbau zur Verfügung, im Vergleich zum Medium ohne Glucose. Dies passt sehr gut zu der um das 1,8-fache höheren Biotrockenmasse in der Kultivierung mit 2 g/L Glucose im Vergleich zur Kultivierung im Glucose-freien Medium. Unter Berücksichtigung der geringen Glucoseaufnahme im Medium mit 10 g/L steht hier die 2,2-fache Menge Kohlenstoff zur Verfügung, die maximale Biotrockenmasse ist jedoch geringer als bei Kultivierungen mit 2 g/L Glucose.

Pyruvat wurde intrazellulär zum exponentiellen Zeitpunkt in ähnlichen Konzentrationen in allen drei Kultivierungen nachgewiesen, zum stationären Zeitpunkt war die Konzentration in den Proben aus der Kultivierung mit 2 g/L Glucose im Medium leicht erhöht. Die Produkte der Buttersäuregärung (Butanoat, 1-Butanol, Pentanoat und 5-Methylhexanoat), welche alle über die gleichen Enzyme metabolisiert werden, zeigten die höchsten Konzentrationen in den stationären Überstandsproben aus der Kultivierung mit 2 g/L Glucose im Medium. In den Überstandsproben der stationären Phase aus der Kultivierung mit 10 g/L Glucose im Medium wurden die geringsten relativen Konzentrationen an Butanoat, Pentanoat und 5-Methylhexanoat nachgewiesen. 1-Butanol zeigte in der stationären Phase ähnliche Konzentrationen in den Überstandsproben aus den Kultivierungen ohne Glucose und mit 10 g/L Glucose im Medium. Die extrazellulären Konzentrationen der Produkte aus den übrigen Fermentationen, Lactat, Ethanol und Acetat, nahmen mit steigender Glucosekonzentration im Medium in den stationären Proben zu. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt für Lactat, das in den Überstandproben der stationären Phase eine um das 40-fache erhöhte relative Konzentration in der Kultivierung mit 2 g/L Glucose und eine um das 118-fache erhöhte relative Konzentration in der Kultivierung mit 10 g/L

Glucose zeigte, verglichen mit Kultivierung ohne Glucose.

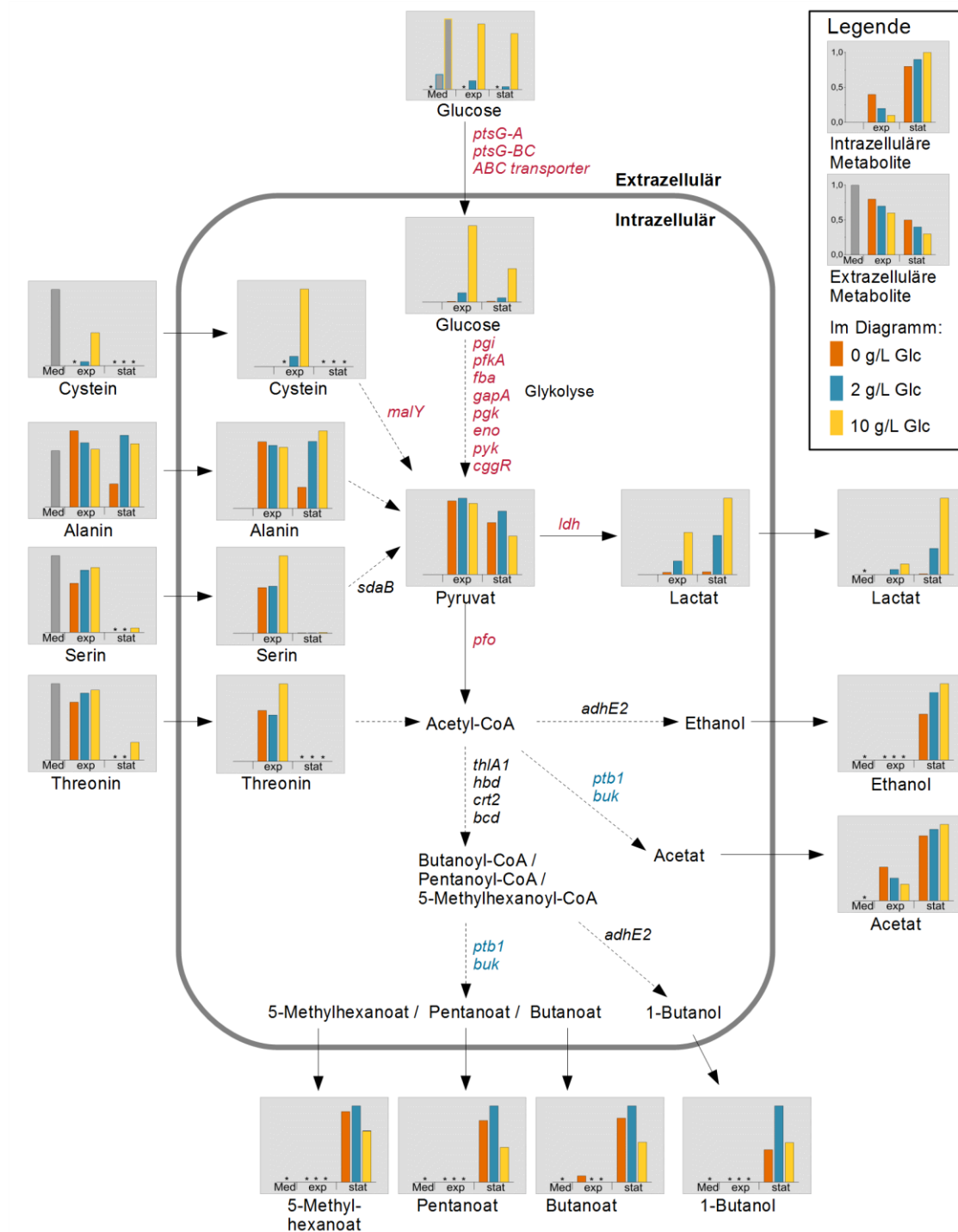


Abb. 15: Übersicht über den Zentralstoffwechsel von *C. difficile* 630Δerm kultiviert mit verschiedenen Glucosekonzentrationen. Dargestellt sind die relativen Werte der detektierten intra- und extrazellulären Metabolite im Medium (Med, grau), der exponentiellen (exp) und der stationären Phase (stat). Die Anfangskonzentration im Medium ist aufgrund der unterschiedlichen Supplementierung für Glucose als Einzelwerte dargestellt. Die Gene geben die Expressionsunterschiede in der stationären Phase der Proben aus der Kultivierung mit 2 g/L Glucose gegen die ohne Zusatz kultivierten Proben wieder: blau: $\log_2 FC \leq -1$, rot: $\log_2 FC \geq 1$, p -Wert $< 0,05$, bestimmt mittels eines DNA-Microarrays.

3.2.1.2. Zusammenhang zwischen Glucosekonzentration und Toxinproduktion von *C. difficile* 630 Δ erm

Die Glucosekonzentration im Medium beeinflusst sowohl den Stoffwechsel als auch die Toxinproduktion. Durch hohe Glucosekonzentrationen wurden die Stickland-Reaktionen und die Buttersäuregärung reduziert und die extrazelluläre Toxinkonzentration war nach 48 h sehr gering. Eine Reduktion des Toxins von *C. difficile* wurde auch für Glucosesupplementierungen in komplexen Medien nachgewiesen (Dupuy und Sonenshein, 1998). In diesen kann eine bereits vorhandene Konzentration an Zuckern oder komplexen Kohlenhydraten nicht ausgeschlossen werden, wodurch auch geringere Glucosekonzentrationen zu einer Reduktion der Toxinproduktion führen könnten. Eine moderate Glucosekonzentration im Medium führte zu einer erhöhten Buttersäuregärung und einer hohen extrazellulären Toxinkonzentration. Dieser Zusammenhang zwischen Glucose und der Toxinkonzentration konnte ebenfalls bereits für den Stamm VPI 10463 in einem auf neun Aminosäuren basierenden Medium nachgewiesen werden (Karlsson et al., 1999). Karlsson et al. (2000) postulierte einen Zusammenhang der Toxinproduktion zu den Produkten der Buttersäuregärung, da Supplementierungsexperimente mit Butanoat zu einer erhöhten Toxinkonzentration führten, während der Zusatz von 1-Butanol einen gegenteiligen Effekt zeigte. Die gegensätzlichen Einflüsse der verschiedenen Glucosekonzentrationen auf die Toxinproduktion und die zugrunde liegenden Regulationen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

3.2.1.2.1. Reduktion der Toxinproduktion durch hohe Glucosekonzentration

Die Reduzierung der Aminosäureumsetzung in den Stickland-Reaktionen und im Zentralstoffwechsel bei einer Supplementierung von 10 g/L Glucose passt zur sogenannten Kohlenstoff-Katabolitrepression (*carbon catabolite repression*; Deutscher et al., 2006). Die Gene werden dabei direkt von Glucose oder über das *Catabolite-Control-Protein* CcpA reguliert. Im Komplexmedium werden 18 % aller Gene in *C. difficile* durch Glucose oder CcpA reguliert, darunter die Zuckeraufnahme und der Energiemetabolismus (Antunes et al., 2012). Die Expression der an der Buttersäuregärung beteiligten Gene wird reduziert (Antunes et al., 2012), was zu den reduzierten Produkten in der Kultivierung mit erhöhter Glucosekonzentration passt (Abb. 15). Des Weiteren werden die Gene der reduktiven Stickland-Reaktion von Leucin/Phenylalanin und der Glycinreduktase-Komplex weniger stark exprimiert (Antunes et al., 2012). Dies ist in der Kultivierung mit 10 g/L Glucose nur im Produkt des

Phenylalanins, 3-Phenylpropanoat, nachzuvollziehen (Abb. 14). Die von der Glucosekonzentration im Medium unabhängige Konzentration an Isocaproat, dem Produkt des Leucins, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Leucin eines der bevorzugten Substrate von *C. difficile* 630 Δ *erm* ist und die Gene der an der Reaktion beteiligten Enzyme zu Beginn des Wachstums stark exprimiert werden. Da Glucose erst ab einem bestimmten Zeitpunkt im Wachstum aufgenommen wird (Neumann-Schaal et al., 2015), kann die Reaktion mit dem bevorzugten Substrat ablaufen, bevor die entsprechenden Gene durch CcpA herunter reguliert werden. Glycin wird in geringeren Mengen aufgenommen, die erhöhte Acetatkonzentration stammt vermutlich aus dem Zentralstoffwechsel. Die Regulation der oxidativen Stickland-Reaktionen wurde nicht nachgewiesen (Antunes et al., 2012), die reduzierten relativen Konzentrationen der entsprechenden Produkte in der Kultivierung mit 10 g/L Glucose (Abb. 14) sprechen aber dafür. Es könnte sich jedoch auch um eine indirekte Regulation durch den reduzierten Stoffwechsel in den reduktiven Stickland-Reaktionen handeln. Bei der Produktion von hohen Lactatkonzentrationen scheint es sich um eine *Overflow*-Reaktion zu handeln. Die Toxinproduktion wird ebenfalls durch CcpA reguliert, welches an die Promotorregion der Toxingene binden kann und so die Expression reduziert (Antunes et al., 2012). Die Regulation durch die Katabolitrepression wird erst bei einer Glucosesupplementierung ab einer bestimmten Konzentration hervorgerufen. Die dadurch hervorgerufene reduzierte Toxinproduktion wurde im Kapitel 3.1.2 ab einer Konzentration von 5 g/L Glucose im Medium detektiert.

3.2.1.2.2. Moderate Glucosekonzentration erhöht Toxinproduktion

Durch die Supplementierung mit 2 g/L Glucose zum Caseinhydrolysat-Medium wurde die extrazelluläre Toxinkonzentration nach 48 h Kultivierung um 88 % erhöht (Abb. 13). Durch die Metabolomdaten allein konnten hierzu keine Rückschlüsse gezogen werden, daher wurde eine Transkriptomanalyse für Proben aus der exponentiellen ($\frac{1}{2}$ OD_{max}) und der stationären Phase (OD_{max}) durchgeführt (Anhang A5). Unterschiede ($-1 \geq \log_2 \text{FC} \geq 1$, p -Wert < 0,05) wurden für 74 Transkripte in den Proben aus der exponentiellen Phase und für 510 Transkripte in den Proben aus der stationären Phase ermittelt. Davon zeigten 27 aus der exponentiellen und 269 aus der stationären Phase eine erhöhte Genexpression. Die stärkste Erhöhung, um das bis zu 32-fache, zeigte sich bei beiden Zeitpunkten für die Expression von Genen, die für Enzyme codieren, die an der Glykolyse, deren Regulation und dem Zuckertransport, sowohl über das Phosphotransferase-System, als auch für

ABC-Transporter, beteiligt sind. Des Weiteren war die Expression von Genen um das bis zu 5-fache erhöht, die für die Enzyme der Spermin-/Spermidinbiosynthese codieren.

Die Spermidinbiosynthese wurde auch in der Kultivierung mit 2 g/L Cystein im Medium erhöht, wo das Wachstum und die Toxinproduktion aufgrund von Eisenmangel eingeschränkt waren (Kapitel 3.4.3). Im Transkriptom war die Expression von Genen, die für Proteine der Eisenaufnahme und des Eisenstoffwechsels codieren, in der stationären Phase herunter reguliert (Tab. 10). Die Spermidinbiosynthese wurde hier gegensätzlich zur Eisenaufnahme reguliert. Dies lässt darauf schließen, dass das Spermidin bzw. Spermin in den mit 2 g/L Glucose kultivierten Zellen in andere Prozesse eingebunden wird. Es könnte an der Biofilmbildung oder dem Schutz vor oxidativem oder Säure-Stress beteiligt sein (Shah und Swiatlo, 2008).

Mit um das bis zu 16-fache am stärksten herunter reguliert, war die Expression von Genen, die Reaktionen im Aminosäureabbau (Stickland) und der Buttersäuregärung katalysieren.

Tab. 10: Übersicht über regulierte Gene des Eisenstoffwechsels zwischen Proben der stationären Phase, die mit 2 g/L oder ohne Glucose im Medium kultiviert wurden. Angegeben sind log2 Fold Changes ($-1 \geq \log_2 \text{FC} \geq 1$, p -Wert $< 0,05$) bestimmt mittels eines DNA-Microarrays.

	Gen	Log2 FC (stat)	Beschreibung
CDIF630erm_01673		-2,09	Putatives Fe-S-Bindungsprotein
CDIF360erm_01433		-2,13	Fe-S-Cluster Assembly-Protein
CDIF630erm_01441	<i>fur</i>	-1,51	transkriptioneller Regulator
CDIF360erm_01693		-1,11	Putative Fe-S Protein
CDIF360erm_01939	<i>feoA3</i>	-1,23	Eisentransport- Protein A

Da die stärksten Unterschiede im Transkriptom und im Metabolom in energieliefernden Stoffwechselwegen zu finden waren, könnte ein Zusammenhang zwischen dem Energieniveau in der Zelle und der Toxinproduktion bestehen. Daher wurde eine Analyse zentraler Metabolite des Energiestoffwechsels (ATP und NAD^+/NADH) von *C. difficile* 630 Δ erm durchgeführt und die intrazelluläre Toxinkonzentration zu fünf Zeitpunkten beginnend ab $\frac{1}{2}$ OD_{max} über die Wachstumskurve bestimmt (Abb. 16).

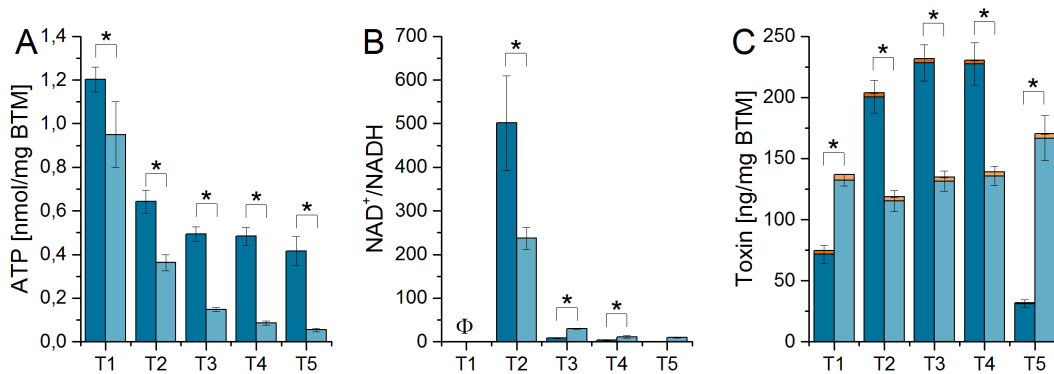


Abb. 16: ATP-Konzentration (A), NAD⁺/NADH-Verhältnis (B) und intrazelluläre Toxinkonzentration (C) in *C. difficile* 630 Δ erm. Kultiviert wurde in Caseinhydrolysat-Medium (hellblau) und supplementiert mit 2 g/L Glucose (dunkelblau). Die Konzentrationen an ATP, NAD⁺ und NADH wurden mittels Enzymassays bestimmt. Die Toxine A (blau) und B (orange) wurden mittels ELISA bestimmt. Die Proben wurden aufgrund des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens in einem 2-Stunden-Intervall bei den Kulturen ohne Glucose und in einem 3-Stunden-Intervall bei den Kulturen mit 2 g/L Glucose im Medium ab $\frac{1}{2}$ OD_{max} geerntet (T1-T5); Φ NADH lag unter dem Detektionslimit. * signifikante Änderung mit p -Wert < 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg. Einzelne Konzentrationen an NAD⁺ und NADH sind im Anhang A6 zu finden.

Die ATP-Konzentrationen zeigten signifikante Unterschiede zu allen fünf Zeitpunkten (Abb. 16 A, p -Wert < 0,05). Die Konzentration in den Proben, die im Medium mit Glucose kultiviert wurden, war um das bis zu 8-fache höher als in Proben, die ohne Glucose kultiviert wurden. Das Verhältnis von NAD⁺ zu NADH war zum Zeitpunkt T2 in den Proben, die mit Glucose kultiviert wurden, mehr als doppelt so hoch wie bei den Kultivierungen ohne Glucose. Zu den späteren Zeitpunkten nahm das Verhältnis in beiden Kultivierungen stark ab (Abb. 16 B).

In den Proben aus der Kultivierung ohne Glucose blieb die Toxinkonzentration über alle Zeitpunkte relativ konstant, nur zum letzten Zeitpunkt nahm sie um 23 % zu. In den mit 2 g/L Glucose kultivierten Proben stieg die Toxinkonzentration zu Beginn an und fiel in der stationären Phase ab. Zum Zeitpunkt T5 wurden nur noch 14 % der Konzentration vom vorherigen Zeitpunkt nachgewiesen. Die maximale Konzentration war in den Zellen, die mit 2 g/L Glucose kultiviert wurden, um das bis zu 1,7-fache erhöht, verglichen mit der intrazellulären Toxinkonzentration der Zellen aus der Kultivierung ohne Glucose (Abb. 16 C). Neben der erhöhten Toxinproduktion wurde bei Kultivierungen mit 2 g/L Glucose im Medium auch die Sekretion der Toxine früher im Wachstumsverlauf eingeleitet.

Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem Energieniveau bzw.

dem Redoxpotential in der Zelle und der Toxinproduktion oder -sekretion hin. Das höhere Verhältnis von NAD^+/NADH in den mit 2 g/L Glucose kultivierten Zellen passt zu den Metabolomdaten. Viele der Reaktionen im Zentralstoffwechsel laufen über eine Oxidation von NADH zu NAD^+ ab. Die Regulation im Stoffwechsel durch das veränderte NAD^+/NADH -Verhältnis wird über einen globalen Redox-Sensor-Regulator (Rex) gesteuert. NAD^+ und NADH binden an Rex, aber nur NADH inhibiert die Bindung an die DNA der Zielgene. Da Rex als Repressor seiner Zielgene fungiert, wird durch hohe NAD^+ -Konzentrationen die Genexpression reduziert (Brekasis und Paget, 2003; Pagels et al., 2010; Pei et al., 2011; Zhang et al., 2014). Bekannte Zielgene von Rex in verschiedenen Clostridia und *Staphylococcus aureus* sind u.a. in Fermentationen, der Glykolyse, im Wood-Ljungdahl-Weg, dem TCA und der der NAD-Biosynthese zu finden (Pagels et al., 2010; Ravcheev et al., 2012; Zhang et al., 2014). Ein indirekter Einfluss von Rex auf die Toxinproduktion wurde postuliert, bedingt durch die Regulation der Buttersäuregärung (Ravcheev et al., 2012; Martin-Verstraete et al., 2016). Eine Regulation durch Rex aufgrund der Unterschiede im NAD^+/NADH -Verhältnis ist daher wahrscheinlich und könnte auch die Unterschiede im Zentralstoffwechsel erklären. In der Kultivierung mit 2 g/L Glucose besteht bis zu Beginn der stationären Phase (T2) ein sehr hohes NAD^+/NADH -Verhältnis, das dann rapide abfällt. Die Expression der Zielgene von Rex wird daher vermutlich während des exponentiellen Wachstums gehemmt. Aufgrund der intrazellulären Toxinkonzentration, die schon zum Zeitpunkt T2 stark angestiegen war, könnte es sich um eine Regulation der Toxinsekretion handeln, die vermutlich indirekt aufgrund des niedrigeren NAD^+/NADH -Verhältnisses in der stationären Phase zustande kommt. Da dies im Transkriptom aufgrund der Bindung des NAD^+ bzw. NADH an das Protein nicht nachverfolgt werden kann, bleibt der genaue Reaktionsmechanismus unklar.

Karlsson et al. (2000) konnten einen Einfluss einer Supplementierung des Mediums mit Butanoat und Butanol, den Fermentationsprodukten in Kultivierungen von *C. difficile*, auf die Toxinproduktion zeigen. Ein Zusatz von 33 mM Butanoat führte in komplexem als auch in Minimalmedium zu einer Erhöhung der gemessenen Toxinkonzentration, während der Zusatz von Butanol zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Toxine führte (Karlsson et al., 2000). Die Zugabe dieser Substanzen zum Medium könnte einen Einfluss auf den Stoffwechsel von *C. difficile* haben, wodurch Unterschiede im zellulären Energieniveau entstehen. Daraus könnten die Unterschiede in der Toxinproduktion resultieren.

Die Toxine A und B in *C. difficile* weisen keine Exportsignatur auf, sondern werden über ein Holin-ähnliches Protein (TcdE) sekretiert, welches Charakteristika eines Membrantransport-Proteins aufweist (Tan et al., 2001a; Govind und Dupuy, 2012; Govind et al., 2015). Holine sind cytolytische Proteine, die von Bakteriophagen produziert werden, um Wirtszellen zu lysieren. Die Toxinsekretion von *C. difficile* über TcdE wurde mittels *tcdE*-defizienten Mutanten nachgewiesen, es wurde aber auch gezeigt, dass in einigen Stämmen die Toxinsekretion auf einer Zelllyse basiert, in Abhängigkeit von der Isoform des TcdE (Olling et al., 2012; Govind et al., 2015; Mehner-Breitfeld et al., 2018). Der Export in *C. difficile* 630 Δ *erm* sollte auf der TcdE vermittelten Sekretion und nicht auf der Zelllyse basieren, da die lange Isoform des TcdE vorliegt (Dannheim et al., 2017a). Im Gegensatz zeigten Wydau-Dematteis et al. (2018) eine auf dem Medium basierende Zelllyse durch das Oberflächen-Membranprotein Cwp19. Zellen, die im BHI gewachsen sind, zeigten im Gegensatz zu Zellen, die im Trypton-Hefeextrakt-Medium gewachsen sind, eine Toxinsekretion basierend auf Zelllyse (Wydau-Dematteis et al., 2018). Obwohl es sich um den gleichen Stamm handelt, konnte die Abnahme der optischen Dichte in der stationären Phase im BHI-Medium nicht beobachtet werden. In Kultivierungen im Caseinhydrolysat-Medium konnte eine Abnahme der optischen Dichte in der stationären Phase beobachtet werden, jedoch nur bei einer Supplementierung von 2 g/L Glucose im Medium (Abb. 13 C). Diese beruht im Caseinhydrolysat-Medium auf einer Zellaggregation bzw. Biofilmbildung, die in den Kulturen in der späten stationären Phase beobachtet werden kann. Da die vorhandene Biomasse durch diesen Prozess in der stationären Phase nicht reduziert wird, kann eine Beteiligung der Zelllyse an der erhöhten Toxinsekretion in den Kultivierungen mit 2 g/L Glucose ausgeschlossen werden.

Es zeigte sich außerdem eine Verringerung der Expression für verschiedene Gene, die für Regulatoren und Signalmoleküle codieren (Anhang A5). Darunter sind Zweikomponentensysteme, welche zur Signaltransduktion genutzt werden, die den Zellen eine Reaktion auf äußere Einflüsse erlaubt (Chang und Stewart, 1998; Hoch, 2000). Diese kann auch im Zusammenhang mit der Virulenz stehen (Beier und Gross, 2006; Tiwari et al., 2017). Eines der in *C. difficile* 630 Δ *erm* regulierten Zweikomponentensysteme (*cprK*) wurde von McBride & Sonenshein (2011) als Regulator für die im gleichen Operon liegenden ABC-Transporter *crpABC* vorgeschlagen. Die entsprechenden Proteine können in *C. difficile* eine Resistenz gegen antimikrobielle Proteine hervorrufen (McBride und Sonenshein, 2011). Die Funktion der anderen

regulierten Zweikomponenten-Histidinkinase-Systeme ist unbekannt. Durch den Mangel an Glucose im Kultivierungsmedium könnte über eines dieser Systeme eine Regulation ausgelöst werden, die einen Effekt auf die Toxinproduktion an sich oder die durch das TcdE vermittelte Sekretion der Toxine aufweist.

3.2.2. L-Lactat reduziert Toxinproduktion

In den durchgeführten Kultivierungen mit niedriger Toxinproduktion bei der Supplementierung von 2 g/L Cystein (Kapitel 3.4.3) bzw. 10 g/L Glucose (Kapitel 3.2.1) wurde eine erhöhte Lactatproduktion festgestellt. Aufgrund dieser Beobachtung wird der Einfluss von extrazellulärem Lactat auf die Toxinproduktion in *C. difficile* 630 Δ erm geprüft. Die L-Form wurde als Supplement für das Medium verwendet, da das produzierte Lactat in Kapitel 3.4.3 als L-Lactat identifiziert wurde und L-Lactat für den menschlichen Stoffwechsel das geeignetere Substrat ist (Wolff und Bidlack, 1976; Gillis et al., 2018). In hohen Konzentrationen ab 5 g/L führte der Zusatz von L-Lactat, auch wenn ebenfalls Glucose im Medium enthalten war, zu einer reduzierten maximalen Biomasse und einer reduzierten Wachstumsrate (Abb. 17 A). Eine Konzentration von 0,5 g/L beeinflusste das Wachstum nicht. Der pH-Wert des zellfreien Überstands lag während der gesamten Kultivierung im neutralen Bereich, jedoch könnte eine hohe Aufnahme des Lactats in *C. difficile* 630 Δ erm zu einer Absenkung des intrazellulären pH-Wertes führen, wodurch das reduzierte Wachstum bei 5 g/L Lactat im Medium erklärt werden könnte.

Die Toxinproduktion zeigte einen Einfluss des Lactats abhängig von dem Kultivierungsmedium (Abb. 17 B und C). Im Caseinhydrolysat-Medium führte eine Supplementierung mit 0,5 g/L L-Lactat zu einer reduzierten extrazellulären Toxinkonzentration in *C. difficile* 630 Δ erm Kulturen. Bei gleichzeitiger Supplementierung mit 2 g/L Glucose zeigte sich kein Einfluss auf die Toxinproduktion.

Aufgrund dieser Unterschiede wurden eine Metabolom- und eine Transkriptomanalyse von Zellen durchgeführt, die in Caseinhydrolysat-Medium und mit einer Supplementierung von 0,5 g/L L-Lactat kultiviert wurden. Es wurden Proben in der exponentiellen ($\frac{1}{2}$ OD_{max}) und der stationären Phase (OD_{max}) geerntet und miteinander verglichen (Einzelwerte im Anhang A7-A9). Die RNA-Extraktion und die Messung mittels DNA-Microarrays wurde von Annika-Marisa Michel (AG Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) durchgeführt. Die Analyse der Transkriptomdaten (Anhang A9) erfolgte eigenständig.

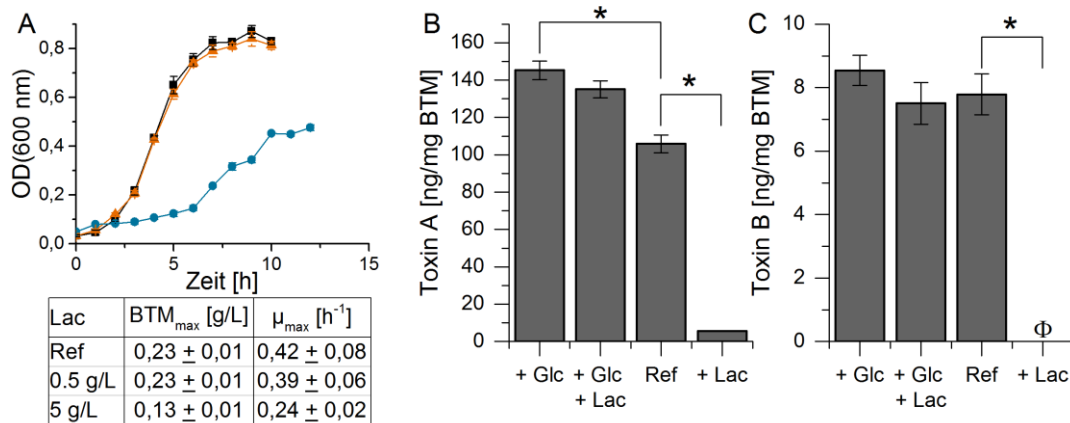


Abb. 17: Wachstum (A) und extrazelluläre Toxinkonzentration (B & C) von *C. difficile* 630Δ*erm* kultiviert mit und ohne Lactatsupplementierung. Es sind Wachstumskurven von *C. difficile* 630Δ*erm* kultiviert in Caseinhydrolysat-Medium (schwarz), supplementiert mit 0,5 g/L L-Lactat (orange) und 5 g/L L-Lactat (blau) mit den entsprechenden maximalen Biotrockenmassen (BTM_{max}) und der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}) dargestellt. Die extrazelluläre Konzentration der Toxine A (B) und B (C) wurde nach 48 h in Kulturüberständen von *C. difficile* 630Δ*erm* aus Caseinhydrolysat-Medium (Ref) und supplementiert mit 2 g/L Glucose (Glc) bzw. 0,5 g/L Lactat (Lac) mittels ELISA bestimmt und auf die Biotrockenmasse bezogen. Φ: nicht detektiert. * signifikante Änderung mit *p*-Wert < 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg.

3.2.2.1. Unterschiede im Metabolom und Transkriptom

Sowohl in den intrazellulären als auch den extrazellulären Metabolomanalysen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden, bis auf Lactat und Pyruvat in der stationären Phase, die nur in den supplementierten Proben gefunden wurden (Abb. 18). Eine Analyse des extrazellulären Lactats in den Kulturüberständen der stationären Phase ergab, dass nur 10 % des L-Lactats aus dem Medium aufgenommen wurde, während D-Lactat in den Überstand sekretiert ist (Abb. 19). Es konnte jedoch im Transkriptom keine Regulation der Genexpression für einen passenden Transporter festgestellt werden.

Für den Export der kurzkettigen Säuren wie Lactat, die in den Zellen durch Fermentation entstehen, existieren mehrere Möglichkeiten. Zum einen können die Fermentationsprodukte durch passive Diffusion aus den Zellen transportiert werden. Dieser Transport ist abhängig vom Konzentrationsgradienten des Metaboliten über die Membran oder dem intra- und extrazellulären pH-Gradienten (Konings et al., 1992). In einigen Bakterien wird Lactat durch passive Diffusion sekretiert (Driessen und Konings, 1990). Eine weitere Möglichkeit ist der Symport mit Protonen. Dieser ist ebenfalls pH- und konzentrationsabhängig (Konings et al., 1992). Für *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*

und *Enterococcus faecalis* wurde der Symport über Protonen für Lactat nachgewiesen (Brink et al., 1980; Otto et al., 1980; Simpson et al., 1983). In einigen Fällen wird das Produkt auch durch denselben Antiporter sekretiert, mit dem das Edukt aufgenommen wird. Dies ist z.B. bei Malat/Lactat in *L. lactis* der Fall (Konings et al., 1992). Aufgrund der hohen extrazellulären Konzentrationen im mit Lactat supplementierten Medium könnte es bei *C. difficile* 630 Δ erm zu einem Import des Lactats durch den Symporter/Antiporter kommen, der ansonsten für den Export des Lactats zuständig ist. Dies würde die geringe Aufnahme an Lactat erklären, da nach einer Gleichgewichtseinstellung über den Membrangradienten kein weiteres Lactat importiert wird.

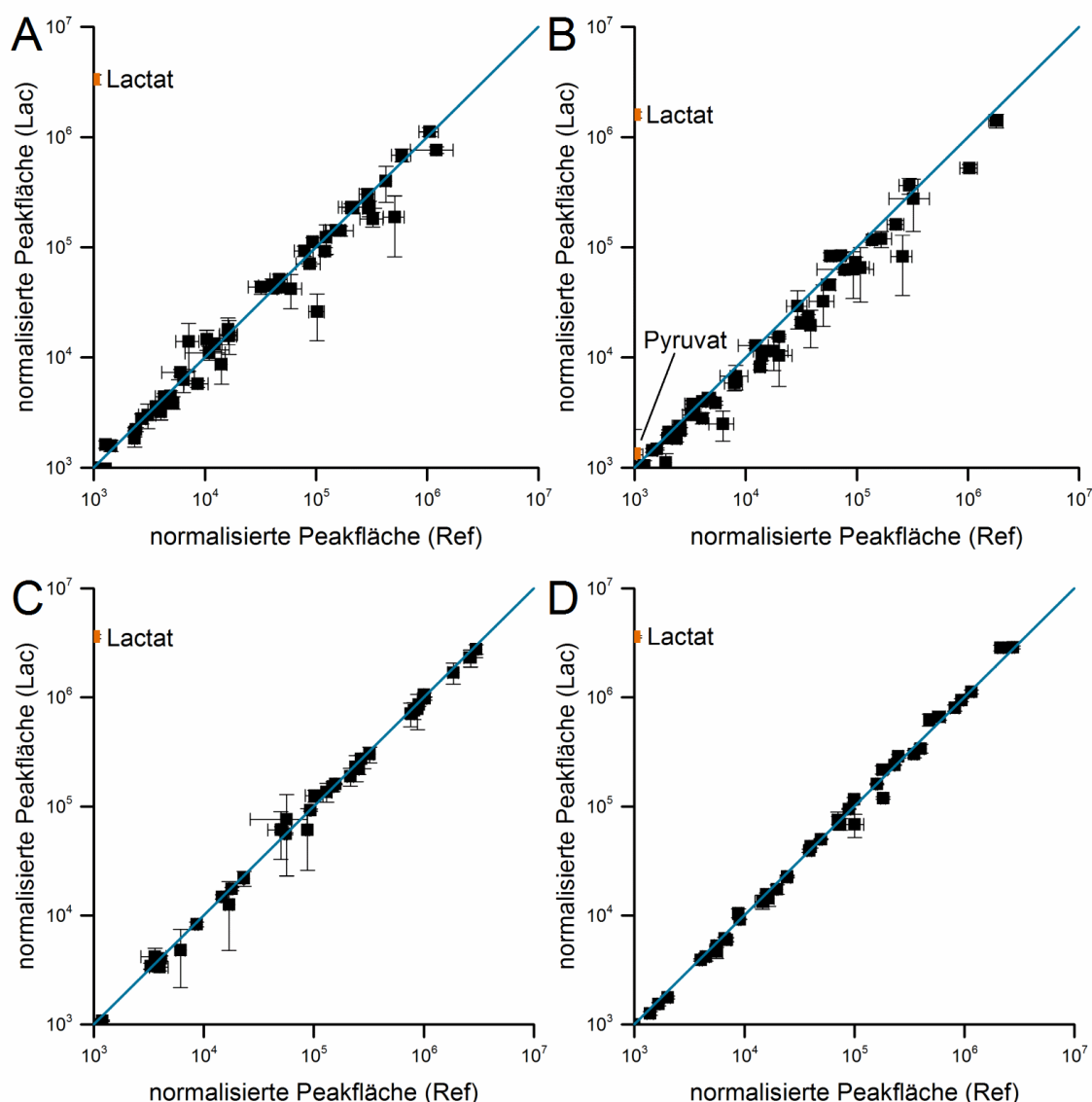


Abb. 18: Scatterplots der intrazellulären (A, B) und extrazellulären (C, D) Metabolomanalyse. Dargestellt werden die detektierten Metabolite in der exponentiellen (A, C) und der stationären Phase (B, D) von *C. difficile* 630 Δ erm, kultiviert in Caseinhydrolysat-Medium und supplementiert mit 0,5 g/L L-Lactat. Signifikant veränderte Metabolite sind orange markiert.

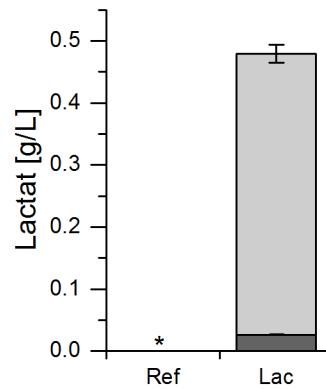


Abb. 19: Bestimmung der Konzentration des D- und L-Lactats im Kulturüberstand in der stationären Phase. Die Lactatkonzentration wurde im Überstand nach 24 h Kultivierung von *C. difficile* 630 Δ erm in Caseinhydrolysat-Medium und supplementiert mit 0.5 g/L L-Lactat mittels eines Enzymassays nachgewiesen; D-Lactat: dunkelgrau; L-Lactat: hellgrau.

In der Transkriptomanalyse wurden zu beiden Zeitpunkten Unterschiede für vier Gene ermittelt ($-1 \leq \log_2 \text{FC} \leq 1$, $p\text{-Wert} < 0,05$). Diese zeigten eine erhöhte Expression um das bis zu 7,3-fache in Zellen, die mit 0,5 g/L Lactat im Medium kultiviert wurden (Tab. 11). Dabei handelt es sich um Gene, die für eine Lactatracemase (LarA), eine Lactatdehydrogenase und die Elektronentransfer-Flavoproteine der Lactatdehydrogenase (EtfAB) codieren, welche alle in einem Operon lokalisiert sind (CDIF630erm_01318 – 01321; Dannheim et al., 2017a). Der Prozess der Elektronen-Bifurkation zwischen Lactat und Pyruvat beruht auf dem exergonen Elektronenfluss vom reduzierten Ferredoxin zum NAD^+ , wodurch das Gleichgewicht auf die Seite des Pyruvats verschoben wird (Weghoff et al., 2015; Dannheim et al., 2017a). Dies ermöglicht die Produktion von Pyruvat und NADH unter physiologischen Bedingungen, wenn Lactat vorhanden ist.

Tab. 11: Übersicht über regulierte Gene von *C. difficile* 630 Δ erm kultiviert in Caseinhydrolysat-Medium und supplementiert mit 0,5 g/L. Angegeben sind Änderungen der Genexpression mit einem \log_2 Fold Change (FC) > 1 , $p\text{-Wert} < 0,05$ für die Proben der Kultivierung mit 0,5 g/L Lactat gegen die ohne Lactat. LDH: Lactatdehydrogenase, EB: Elektronen-Bifurkation.

	Gen	Log2 FC (exp)	Log2 FC (stat)	Beschreibung
CDIF630erm_01320	<i>etfA4</i>	2,77	2,88	LDH (EB), Elektronentransfer-Flavoprotein α -Untereinheit
CDIF360erm_01321		2,52	2,59	LDH (EB), Katal. Untereinheit
CDIF630erm_01318	<i>larA</i>	1,52	1,42	Lactatracemase
CDIF360erm_01319	<i>etfB4</i>	1,21	1,35	LDH (EB), Elektronentransfer-Flavoprotein β -Untereinheit

3.2.2.2. Energieniveau der Zellen und Zusammenhang zur Toxinproduktion

Da sich auch hier ein Zusammenhang zwischen Energieniveau in der Zelle und Toxinproduktion postulieren lässt, wurde die intrazelluläre Toxin- und ATP-Konzentration sowie das Verhältnis von NAD^+/NADH beginnend ab $\frac{1}{2} \text{OD}_{\text{max}}$ bis in die stationäre Phase bestimmt (Abb. 20 und 21, Anhang A6 mit Einzelwerten). Die ATP-Konzentration in den Zellen aus der Kultivierung in Caseinhydrolysat-Medium war zum Zeitpunkt T1 ($\frac{1}{2} \text{OD}_{\text{max}}$) signifikant höher (p -Wert $< 0,05$) als in den Zellen aus der Kultivierung mit Lactatsupplementierung. Die anderen Zeitpunkte zeigten eine ähnliche ATP-Konzentration zwischen den zwei Kultivierungen. Insgesamt nahm die Konzentration über die Zeit ab. Aufgrund der ähnlichen Konzentrationen kann davon ausgegangen werden, dass die ATP-Konzentration keinen direkten Einfluss auf die Toxinproduktion hat (Abb. 20 A).

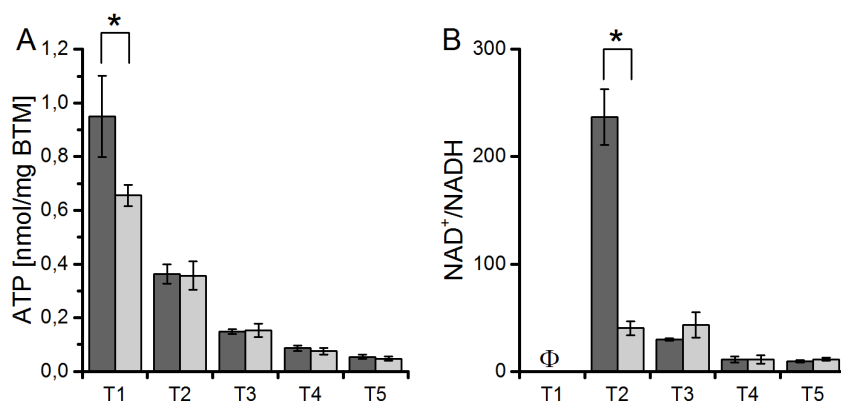


Abb. 20: ATP-Konzentration (A) und NAD^+/NADH -Verhältnis (B) in *C. difficile* 630 Δerm kultiviert mit und ohne Lactat im Medium. Kultiviert wurde in Caseinhydrolysat-Medium (dunkelgrau) und supplementiert mit 0,5 g/L L-Lactat (hellgrau). Die Konzentrationen an ATP, NAD^+ und NADH wurden mittels Enzymassays bestimmt. Die Proben wurden in einem 2-Stunden-Intervall ab $\frac{1}{2} \text{OD}_{\text{max}}$ geerntet (T1-T5); Φ NADH lag unter dem Detektionslimit. * signifikante Änderung mit p -Wert $< 0,05$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg.

Das Verhältnis zwischen NAD^+/NADH war zum Zeitpunkt T2 in den Zellen, die in Caseinhydrolysat-Medium kultiviert wurden, um das 6-fache höher als in Zellen, die mit Lactat im Medium kultiviert wurden (Abb. 20 B). In den im unsupplementierten Medium kultivierten Zellen nahm das Verhältnis zum Zeitpunkt T3 stark ab, während es in den Zellen mit Lactatsupplementierung im Kultivierungsmedium konstant blieb. Zu den Zeitpunkten T4 und T5 waren die NAD^+/NADH -Verhältnisse beider Kultivierungen auf einem ähnlichen Niveau. Die höhere NADH-Konzentration in den mit Lactat kultivierten Zellen passt zu dem im Transkriptom regulierten Prozess der Elektronenbifurkation, da die Oxidation vom Lactat zum Pyruvat über die Reduktion von NAD^+ zu NADH abläuft.

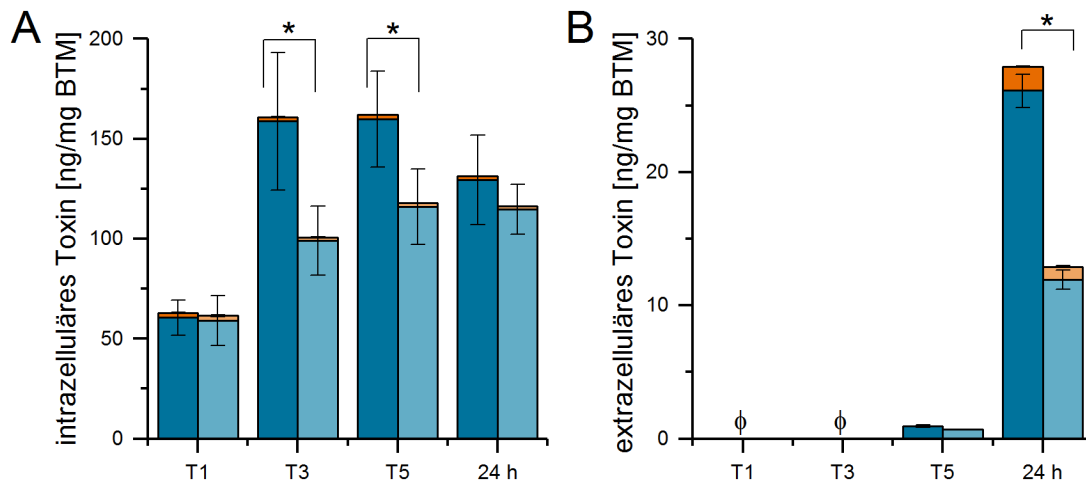


Abb. 21: Intrazelluläre (A) und entsprechende extrazelluläre Toxinkonzentration (B) in *C. difficile* 630 Δ erm, kultiviert in Caseinhydrolysat-Medium (dunkle Farbe) und supplementiert mit 0.5 g/L Lactat (helle Farbe). Die Toxine A (blau) und B (orange) wurden mittels ELISA bestimmt. Die Proben wurden in einem 4-Stunden-Intervall (T1/T3/T5) ab $\frac{1}{2}$ OD_{max} und nach 24 h Kultivierungsdauer geerntet; * p -Wert < 0.05 (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg); Φ kein Toxin nachweisbar.

Intrazellulär konnte eine geringere Toxinkonzentration der Zellen, die mit Lactat im Medium kultiviert wurden, bei den Zeitpunkten T3 und T5, also ab Beginn der stationären Phase, nachgewiesen werden (Abb. 21). Die Toxine im Überstand wurden zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt. Ab dem Zeitpunkt T5 konnten sehr geringe extrazelluläre Konzentrationen an Toxin A detektiert werden und nach 24 h zeigte sich eine um das 2,2-fache geringere Toxinkonzentration in den Überstandproben der mit Lactat kultivierten Zellen.

Ein Zusammenhang zwischen der Lactatdehydrogenase und der Virulenz wurde für andere Pathogene postuliert. In *Enterococcus faecalis* sind zwei L-Lactatdehydrogenasen annotiert, wovon für eine die Reaktion vom Lactat zum Pyruvat postuliert ist. Eine Deletionsmutante beider Lactatdehydrogenasen führte zu einer schlechteren Besiedelung *in vivo* (Rana et al., 2013). In *Staphylococcus aureus* wird bei nitrosativem Stress, der bei der zellulären Immunantwort im Wirt produziert wird, eine homolaktische Fermentation eingeleitet, wodurch die schädlichen Folgen auf den Stoffwechsel umgangen werden können (Richardson et al., 2008). In *Bacillus cereus* wurde für eine Lactatdehydrogenase-defiziente Mutante eine verringerte Toxingexpression nachgewiesen. Es wurde zum einen eine mögliche Regulation durch einen Regulator wie Rex oder aber eine Regulation durch die Lactatdehydrogenase selbst postuliert, da diese Ähnlichkeiten zu in Eukaryoten als einzelsträngige DNA-Bindungsproteine identifizierten Lactat-

dehydrogenasen zeigte (Laouami et al., 2011). Diese Ähnlichkeit konnten in *C. difficile* 630 Δ erm nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse könnte eine Regulation aufgrund des stark veränderten NAD⁺/NADH-Verhältnisses vermutet werden. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben finden durch den Redox-Sensor-Regulator Rex jedoch vor allem Regulationen im Stoffwechsel, wie der Buttersäuregärung oder anderen Fermentationen, statt (Ravcheev et al., 2012; Zhang et al., 2014). Da in diesem Fall nur Änderungen im Lactatstoffwechsel nachgewiesen werden konnten, ist eine Regulation durch Rex unwahrscheinlich. Jedoch könnte die Toxinkonzentration bzw. die Toxinsekretion über einen anderen Mechanismus mit dem Redoxstatus in der Zelle in Zusammenhang stehen, da das NAD⁺/NADH-Verhältnis sowohl im Kapitel 3.2.1 und mit dem zugesetzten Lactat zum Zeitunkt T2 bei einer niedrigeren Toxinkonzentration ebenfalls geringer war.

Ein direkter Einfluss auf die Expression der Toxingene bzw. *tcdR* und *tcdC*, die für Regulatorproteine der Toxingenexpression codieren (Mani und Dupuy, 2001; Matamouros et al., 2007), kann ausgeschlossen werden, da diese im Transkriptom keine Regulation zeigten.

In *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus mutants* wurden zwei Holin-ähnliche Proteine CidA und LrgA nachgewiesen, die an der Biofilmbildung und der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt sind (Ahn et al., 2010; Ranjit et al., 2011; Saier und Reddy, 2015). In *S. aureus* wurden CidA und LrgA als membran-assoziierte Proteine identifiziert, die durch die Bildung von Disulfidbrücken zu hochmolekularen Komplexen oligomerisieren, wodurch die „Lochstruktur“ gebildet wird, die zur Lyse der Zellen führt oder wodurch die entsprechenden Proteine sekretiert werden (Ranjit et al., 2011; Saier und Reddy, 2015). Die Notwendigkeit der Disulfidbrücken für die Stabilität des Komplexes wurde durch die Zugabe eines Reduktionsmittels bestätigt, da die Proteine dadurch in die monomere Form überführt wurden (Ranjit et al., 2011). Änderungen im Redox-Status der Zelle könnten daher einen Einfluss auf die Bildung der „Lochstruktur“ haben.

In der Sequenz des TcdE (Dannheim et al., 2017a) von *C. difficile* 630 Δ erm, welches als Sekretionssystem der Toxine identifiziert wurde (Govind und Dupuy, 2012; Mehner-Breitfeld et al., 2018), sind 5 Cysteine zu finden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Ausbildung der Struktur für die Sekretion der Toxine durch die Veränderungen im Redoxpotential der Zelle beeinflusst wird.

Aufgrund der Daten könnte die geringere intrazelluläre und extrazelluläre Toxinkonzentration auch im Zusammenhang mit der intrazellulären Lactatkonzentration

stehen. Wenn das L-Lactat, wie vermutet, aufgrund der hohen extrazellulären Konzentration aufgenommen wird, kann ein Einfluss der intrazellulären Lactatkonzentration nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine extrazelluläre L-Lactatkonzentration in einem zuckerfreien Medium die extrazelluläre Toxinkonzentration reduzieren kann. Das L-Lactat wird über Elektronen-Bifurkation in Pyruvat umgesetzt, was zu Veränderungen im NAD^+/NADH führt. Dadurch könnte die Toxinsekretion durch TcdE aufgrund von Konformationsänderungen beeinflussen. Der Einfluss des Lactats auf die Toxinproduktion und in höheren Konzentrationen auch auf das Wachstum von *C. difficile* könnte auch den positiven Effekt von Probiotika bei Infektionen mit CDI erklären. Die Probiotika *Lactobacillus casei* und *Bifidobacterium breve* zeigen einen starken Effekt auf das Wachstum von *C. difficile in vitro* (Tejero-Sariñena et al., 2013). Dabei handelt es sich um Probiotika, die L-Lactat in größeren Mengen produzieren können (Vaccari et al., 1993; Matsuki et al., 2013). Die Zufuhr von L-Lactat im Zusammenhang mit einer kohlenhydratarmen Ernährung könnte eine Möglichkeit darstellen, die Toxinproduktion während einer Infektion mit *C. difficile* zu reduzieren.

3.2.3. Mannose zeigt Einfluss auf die Zellaggregation

Im Kapitel 3.1.2 wurde eine signifikant erhöhte Toxinproduktion in *C. difficile* 630 Δ erm festgestellt, als die Glucose im Medium durch Mannose ersetzt wurde. Um die zugrunde liegenden Änderungen im Stoffwechsel aufzudecken, wurde *C. difficile* 630 Δ erm in Caseinhydrolysat-Medium mit 2 g/L Mannose bzw. 2 g/L Glucose kultiviert und Metabolomproben der exponentiellen und stationären Phase verglichen. Die Wachstumskurven der Kultivierungen wiesen einen ähnlichen Verlauf bis zum Übergang in die stationäre Phase auf. In der stationären Phase zeigte sich in den Kulturen mit Glucose im Medium die bereits bekannte Zellaggregation, diese konnte in den Kultivierungen mit Mannose im Medium nicht nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Das extrazelluläre Toxin war nach 48 h in den Kultivierungen mit Mannose im Medium um das 3,0-fache für Toxin A und um das 1,6-fache für Toxin B erhöht (Abb. 22 B).

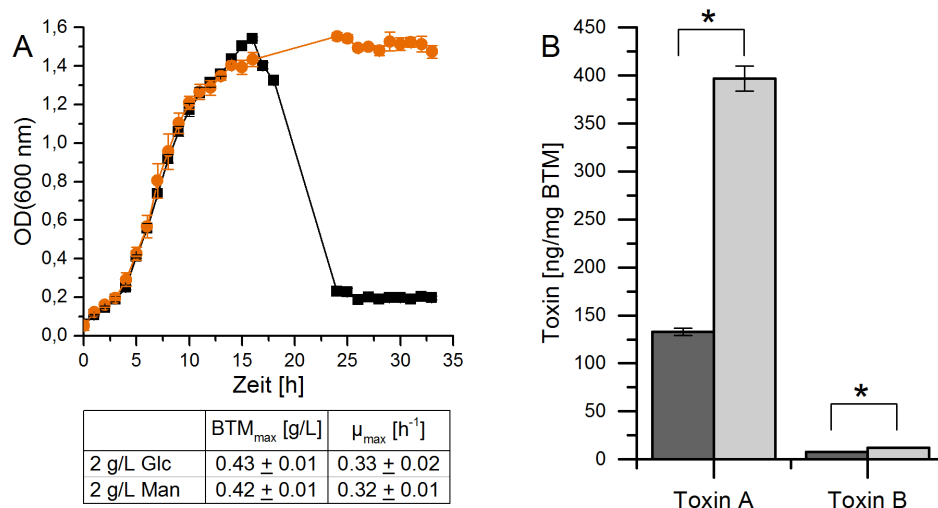


Abb. 22: Wachstum (A) und extrazelluläre Toxinkonzentration (B) von *C. difficile* 630Δ*erm* kultiviert mit 2 g/L Glucose bzw. Mannose. A: Dargestellt sind Wachstumskurven von *C. difficile* 630Δ*erm* aus drei unabhängigen Kultivierungen in Caseinhydrolysat-Medium supplementiert mit 2 g/L Glucose (schwarz) bzw. 2 g/L Mannose (orange) mit der entsprechenden maximalen Biotrockenmasse (BTM_{max}) und der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}). B: Die extrazelluläre Toxinkonzentration wurde nach 48 h in Kulturüberständen von *C. difficile* 630Δ*erm* mittels ELISA bestimmt und auf die Biotrockenmasse bezogen: dunkelgrau: supplementiert mit 2 g/L Glucose, hellgrau: supplementiert mit 2 g/L Mannose. * signifikante Änderung mit *p*-Wert < 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg.

3.2.3.1. Auswirkungen des Zuckers auf den Stoffwechsel

Aufgrund des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens in der stationären Phase wurde die Zuckeraufnahme und -verwertung untersucht (Abb. 23). Die Mannose wurde im Vergleich zur Glucose schon früher, aber langsamer, aufgenommen. Zum exponentiellen Zeitpunkt waren noch $55,5 \pm 1,5$ % Mannose im Überstand vorhanden, während es in der Kultivierung mit Glucose noch $93,9 \pm 3,6$ % waren. Zum stationären Zeitpunkt waren nur noch $2,7 \pm 0,5$ % Glucose im Überstand vorhanden, während es bei der Mannose noch $29,3 \pm 1,4$ % waren.

In der Aminosäureaufnahme konnten signifikante Änderung erst in den 48 h Proben nachgewiesen werden. Alanin, Aspartat, Glycin, Isoleucin, Methionin, Tyrosin und Valin wurden in den Kultivierungen mit Mannose vermehrt aufgenommen (Abb. 24 und 25). Bei den Produkten der Stickland-Reaktionen waren 3-Phenylpropanoat und *p*-Cresol, die Produkte der reduktiven bzw. oxidativen Stickland-Reaktion von Phenylalanin und Tyrosin, nach 48 h in den Kultivierungen mit Mannose erhöht. Die aromatischen Aminosäuren werden demnach in der stationären Phase zur Energiegewinnung eingesetzt. Insgesamt war der Aminosäureabbau über die Stickland-Reaktionen in den

mit Mannose kultivierten Zellen ab der stationären Phase erhöht, im Vergleich zur Kultivierung mit Glucose im Medium.

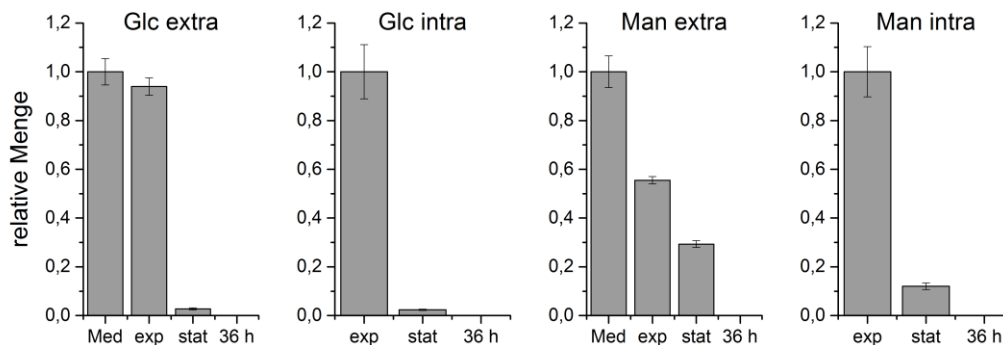


Abb. 23: Relative extrazelluläre und intrazelluläre Konzentration des jeweiligen Zuckers in Kultivierungen von *C. difficile* 630 Δ erm. Kultiviert wurde in Caseinhydrolysat-Medium supplementiert mit 2 g/L Glucose (Glc) bzw. Mannose (Man). Dargestellt sind die relativen Mengen im Medium (Med), zu den Erntezeitpunkten $\frac{1}{2}$ OD_{max} (exp), OD_{max} (stat) und zum Zeitpunkt der Toxinbestimmung nach 48 h.

Im Zentralstoffwechsel zeigten sich geringere extrazelluläre Konzentrationen für Lactat in der exponentiellen und stationären Phase. Dies wird mit der langsameren Aufnahme des Zuckers in Zusammenhang stehen, da diese Reaktion, wie in den Kapiteln 3.4.2 (Cystein) und 3.2.1 (10 g/L Glucose) gezeigt, eine *Overflow*-Reaktion in *C. difficile* 630 Δ erm darstellt.

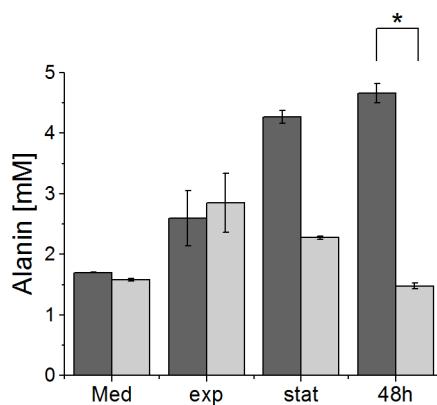


Abb. 24: Verlauf der extrazellulären Alaninkonzentration in Kultivierungen von *C. difficile* 630 Δ erm. Kultiviert wurde in Caseinhydrolysat-Medium supplementiert mit 2 g/L Glucose (dunkelgrau) oder Mannose (hellgrau). Die Alaninkonzentrationen in Überstandsproben vom Medium (Med), der exponentiellen Phase (exp), der stationären Phase (stat) und nach 48 h Kultivierung wurden mittels HPLC-FLD bestimmt. * signifikante Änderung mit p -Wert < 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg.

Bis auf Lactat waren alle detektierten Fermentationsprodukte des Zentralstoffwechsels nach 48 h in den mit Mannose kultivierten Proben erhöht. Die im Zentralstoffwechsel abgebauten Aminosäuren Cystein, Serin und Threonin wurden in beiden Kultivierungen vor Beginn der stationären Phase vollständig aufgenommen. Alanin wurde in den mit Glucose kultivierten Proben über die komplette Kultivierung sekretiert, während es in den Kultivierungen mit Mannose im Medium bis zur exponentiellen Phase sekretiert, in der stationären Phase aber wieder aufgenommen wurde (Abb. 24). Die erhöhten Konzentrationen der Fermentationsprodukte stehen im direkten Zusammenhang mit dem erhöhten Abbau des Alanins in der stationären Phase. Des Weiteren bestehen Unterschiede in dem Abbau des Threonins, da zum stationären Zeitpunkt und nach 48 h 2-Hydroxybutanoat, ein Zwischenprodukt des Abbaus zum Propanoyl-CoA, in den Kultivierungen mit Mannose in geringeren Konzentrationen vorlag.

Metabolite	relative Änderung			Metabolite	relative Änderung		
	exp	stat	48 h		exp	stat	48 h
Aminosäuren				Stickland oxidativ			
Alanin	1,10	0,53	0,32 *	Isovalerat	1,02	0,93	0,92 *
Arginin	0,93			2-Methylbutanoat	1,33 *	1,12 *	1,30 *
Aspartat	1,01	0,96	0,67 *	Isobutanoat	1,25 *	1,12 *	1,29 *
Glutamat	1,02	0,98	0,96	Phenylacetat	1,17 *	1,12	1,46 *
Glycin	0,96	0,93	0,53 *	4-OH-Phenylacetat	1,18 *	0,89	0,84
Histidin	1,01	1,02	0,96 *	p-Cresol	1,17 *	1,26 *	1,62 *
Isoleucin	0,87	0,61	0,23 *	Zentralstoffwechsel			
Leucin	0,74			Ethanol		1,01	1,32 *
Lysin	0,92	1,00	0,94	1-Propanol		1,39 *	1,60 *
Methionin	0,98	0,98	0,63 *	2-Methyl-1-propanol		1,35 *	2,44 *
Phenylalanin	1,05	0,98	0,88	1-Butanol		1,04	2,27 *
Prolin				3-Methyl-1-butanol		1,07	1,36 *
Serin	0,77		† *	1-Hexanol			†† *
Threonin	0,90			Acetat	1,46 *	0,86 *	1,13 *
Tyrosin	1,36	0,94	0,57 *	Lactat	0,34 *	0,45 *	0,79 *
Valin	0,94	0,74	0,32 *	Propanoat	1,48 *	1,20	1,17 *
Stickland reduktiv				Butanoat	†† *	0,91	1,35 *
2-Hydroxyisocaproat	1,45 *	0,62 *	0,71 *	Pentanoat	1,19	1,12	1,53 *
Isocaproat	2,85 *	0,99	1,00	Hexanoat		†† *	1,41 *
3-Phenyllactat	†† *	0,65 *	1,05	5-Methylhexanoat	†† *	1,20 *	1,45 *
3-Phenylpropanoat		1,08	1,78 *	2-Hydroxybutanoat	†† *	0,54 *	0,13 *
5-Aminovalerat	1,00	0,99	0,95 *	2-Aminobutanoat	1,49 *	1,05	0,86
4-(Methylthio)butanoat			†† *				

< 0,25
0,25 - 0,67
0,67 - 1,5
1,5 - 4

Abb. 25: Heatmap mit relativen Änderungen ausgewählter extrazellulärer Metabolite von *C. difficile* 630Δ_{erm}. Die relativen Änderungen wurden durch den Vergleich der mit Mannose zu den mit Glucose kultivierten Proben entsprechend der Wachstumsphase berechnet. * signifikante Änderung (p -Wert < 0,05, bestimmt mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Benjamini/Hochberg-Korrektur), † nur detektiert in Kultivierungen mit Glucose; †† nur detektiert in Kultivierungen mit Mannose. Foldchanges aller detektierten extrazellulären Metabolite sind im Anhang A10 zu finden.

3.2.3.2. Zusammenhang zwischen Zucker im Medium und Toxinproduktion

Im Stoffwechsel waren erst nach 48 h Unterschiede in der Aminosäureaufnahme und deren Abbau erkennbar. Während der Wachstumsphase ergaben sich Unterschiede in der Aufnahme des Zuckers, die sich aber im Zentralstoffwechsel nicht zeigten. Die erhöhte Toxinproduktion könnte sich daher erst in der stationären Phase ergeben, indem durch die erhöhte Aufnahme der Aminosäuren die Konzentration im Kulturüberstand soweit sinkt, dass eine erhöhte Regulation der Toxingene induziert wird, z.B. durch den Regulator CodY.

Eine andere Möglichkeit ist der Einfluss des Zuckers auf die Zellaggregation bzw. Biofilmbildung. Die in den Kultivierungen im Caseinhydrolysat-Medium mit Glucose beobachtete Zellaggregation konnte in den Kultivierungen mit Mannose nicht beobachtet werden. *C. difficile* bildet Biofilme, deren Matrix aus Proteinen, DNA und Polysacchariden besteht (Dapa und Unnikrishnan, 2013). Im Caseinhydrolysat-Medium mit Glucose bildet *C. difficile* 630 Δ erm ein Polysaccharid, das aus acetylierten Glucoseeinheiten besteht und aus der aufgenommenen Glucose gebildet wird (Dannheim et al., 2017b). In komplexem Medium konnte gezeigt werden, dass *C. difficile* 630 Glucose für die Biofilmbildung benötigt (Dapa et al., 2013). Die geringere Zellaggregation in der Kultivierung mit Mannose im Medium spricht dafür, dass die Bildung des Polysaccharids stark eingeschränkt wird, wodurch die Biofilmbildung ausbleibt. Da innerhalb der Zellaggregation bzw. des Biofilms für *C. difficile* 630 Δ erm andere Bedingungen vorliegen als für planktonische Zellen, könnte dies die Unterschiede in der extrazellulären Toxinkonzentration erklären. In einer Transkriptomstudie von Poquet et al. (2018) über den Vergleich eines Biofilms gegen planktonische Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *tcdA*, aber nicht *tcdB*, im Biofilm verringert war. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression von Genen, die für Enzyme der Fermentationen im Zentralstoffwechsel codieren, reduziert war (Poquet et al., 2018). Dies passt zu den erhöhten Metaboliten des Zentralstoffwechsels, die in den Überständen der 48 h-Proben detektiert wurden (Abb. 25). In der Studie von Poquet et al. (2018) wurde zudem gezeigt, dass die Daten Biofilm/planktonische Zellen sehr gut mit Daten korrelieren, in denen die Genexpression von Zellen in der exponentiellen Phase mit denen zu Beginn der stationären Phase verglichen wurde (Saujet et al., 2011). Dies bestätigt die hier festgestellten Unterschiede aufgrund der Zellaggregation in den Kultivierungen mit Glucose im Medium.

Im natürlichen Lebensraum ist der Biofilm die am häufigsten vorkommende

Wachstumsform und kann auch für die Infektion und das Krankheitsbild wichtig sein (Hall-Stoodley et al., 2004). Der Aufbau einer Monosaccharid-Konzentration im Darm, die einen Einfluss auf die Toxinproduktion oder die Biofilmbildung zeigen könnte, ist aufgrund der schnellen Resorption im Darm (Ganong und Auerswald, 1972) kaum möglich. Die Störung der Biofilmbildung könnte jedoch einen guten Angriffspunkt für Therapeutika darstellen, da diese auch mit der oft wiederkehrenden Infektion von pathogenen Bakterien in Zusammenhang gebracht wird (Hall-Stoodley und Stoodley, 2009).

3.3. Zeitaufgelöste Analyse der Virulenz-assoziierten Stoffwechselanpassungen in CDMM

Die Daten und Inhalte des folgenden Kapitels 3.3.1 wurden im *Journal Frontiers in Microbiology* (Hofmann et al., 2018) publiziert.

Das von *C. difficile* 630 Δ erm produzierte Toxin wird im Kulturüberstand erst in der stationären Wachstumsphase des Organismus nachgewiesen (Karlsson et al., 1999; Neumann-Schaal et al., 2015), wohingegen eine Sekretion in der exponentiellen Phase nicht stattfindet. Während des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre Phase erfolgen im Stoffwechsel globale Änderungen, die einen Einfluss auf die Toxinproduktion oder die Sekretion aufweisen könnten. Um diese Zusammenhänge aufzudecken, wurde *C. difficile* 630 Δ erm im CDMM (Caseinhydrolysat-Medium mit 0,5 g/L Cystein und 2 g/L Glucose) kultiviert. Es wurden Proben zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums, bis in die stationäre Phase, untersucht.

3.3.1. Untersuchung der Stoffwechselanpassungen im CDMM

Für die Kultivierung im CDMM wurden neben Metabolom- auch Transkriptom- und Proteomanalysen durchgeführt, um die genauen Abläufe im Stoffwechsel und deren Zusammenhang systembiologisch erfassen zu können. Ein Fokus wurde auf die von *C. difficile* genutzten Stoffwechselwege zur Energiegewinnung gelegt: der Abbau von Aminosäuren und Glucose über die Stickland-Reaktionen und den Zentralstoffwechsel.

Die RNA-Extraktion und die Messungen der DNA-Microarrays wurde von Mareike Berges und Annika-Marisa Michel (AG Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) durchgeführt. Die Analyse der Transkriptomdaten erfolgte eigenständig. Die Proteine wurden aus drei subzellulären Fraktionen (Cytosol, Membran und

sekretierte Proteine im Überstand) extrahiert und mittels LC-MS/MS von Andreas Otto (AG Becher, Institut für mikrobielle Proteomik, Uni Greifswald) gemessen. Die in dieser Arbeit aufgeführte Interpretation zu Proteindaten erfolgte eigenständig. Es wurden Proben in der exponentiellen Phase, bei $\frac{1}{2}$ OD_{max} (exp), in der transienten Phase, die den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase beschreibt (trans), zu Beginn der stationären Phase (stat1) und zu zwei späteren Zeitpunkten in der späteren stationären Phase (stat2: stat1 + 5 h; stat3: stat1 + 10h) genommen (Anhang A11-A16).

3.3.1.1. Änderungen in den Stickland-Reaktionen

Prolin war die am schnellsten aufgenommene und umgesetzte Aminosäure in *C. difficile* 630Δ*erm*. Bereits in der exponentiellen Phase konnte es extrazellulär nicht mehr nachgewiesen werden und beim Übergang in die stationäre Phase war es vollständig umgesetzt. Die Glycinkonzentration im Überstand nahm während der gesamten Kultivierung ab. Interessanterweise zeigte sich intrazellulär ein Maximum des Metaboliten in der exponentiellen Phase, gefolgt von einem rapiden Abfall in der transienten Phase (Abb. 26). Der rapide Abfall des intrazellulären Glycins zum transienten Zeitpunkt kann durch eine erhöhte Umsetzung durch den Glycin-Reduktase-Komplex erklärt werden. Dieser war zum transienten Zeitpunkt sowohl im Transkriptom als auch im Proteom hoch reguliert. Studien zu dem Glycin-Reduktase-Komplex und dem D-Prolin-Reduktase-Komplex zeigten Zusammenhänge in der Regulation beider Enzymkomplexe (Jackson et al., 2006; Bouillaut et al., 2013). Die Zugabe von Prolin zum Medium erhöhte die Menge des Prolin-Reduktase-Komplexes während der Kultivierung mit *C. difficile*. Gleichzeitig wurde die Expression der Gene des Glycin-Reduktase-Komplexes über den Regulator PrdR gehemmt (Bouillaut et al., 2013). Unter Berücksichtigung der im Experiment bestimmten intra- und extrazellulären Prolinkonzentrationen erklärt dies den Anstieg des Glycinabbaus in der späten exponentiellen Phase, da Prolin zu diesem Zeitpunkt im Kulturüberstand verbraucht ist. Acetat, das Produkt des Glycinabbaus über die Stickland-Reaktion, zeigte ab der transienten Phase nur eine geringe Akkumulation im Überstand. Dies deutet darauf hin, dass Glycin hauptsächlich über Acetyl-Phosphat in Acetyl-CoA und anschließend im Zentralstoffwechsel umgesetzt wird.

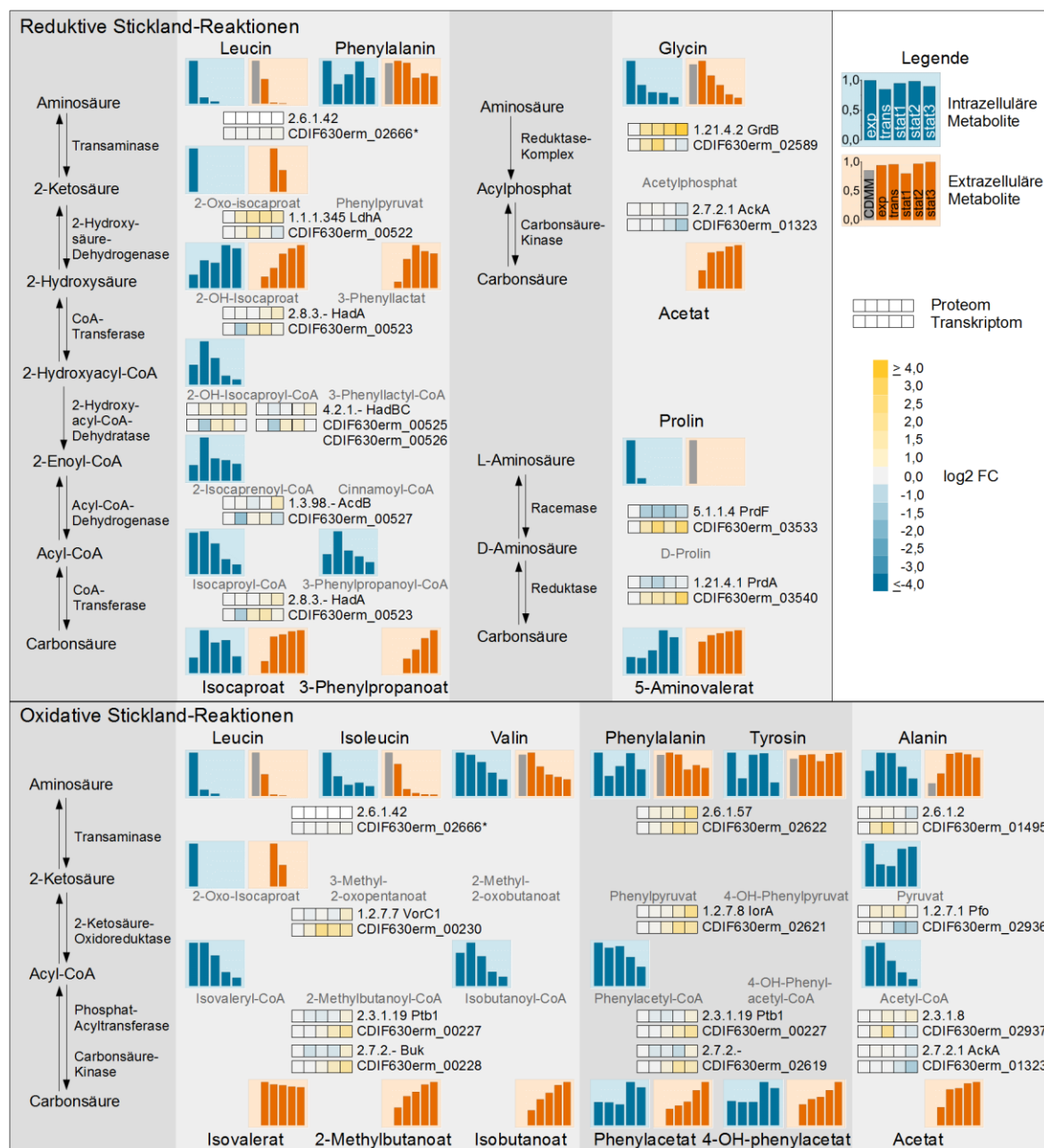


Abb. 26: Zeitaufgelöste Darstellung vom Metabolom, Proteom und Transkriptom der reduktiven und oxidativen Stickland-Reaktionen in *C. difficile* 630 Δ erm kultiviert in CDMM. Auf der linken Seite sind die Stoffwechselwege dargestellt. Auf der rechten Seite sind die individuellen Reaktionen der Aminosäuren in den reduktiven (oben) und den oxidativen (unten) Stickland-Reaktionen mit den entsprechenden Transkriptom- und Proteomdaten repräsentativer Gene/Proteine dargestellt. Die Säulen und Quadrate stehen von links nach rechts für die einzelnen Probenahmezeitpunkte exp, trans, stat1, stat2 und stat3. Die Quadrate zeigen die log2 Fold Changes (FC) der einzelnen Zeitpunkte im Vergleich zum exponentiellen Zeitpunkt des cytosolischen Proteoms (oben) und des Transkriptoms (unten). Die Säulendiagramme stellen die relativen Werte der extrazellulären (blau) und intrazellulären (orange) Metabolite bezogen auf die höchste Konzentration dar. Die graue Säule im Exometabolom steht für die eingesetzte Konzentration im Medium. Nicht dargestellte Metabolite wurden in der GC- oder LC-MS Messung nicht nachgewiesen. * nicht detektiert im Proteom.

Leucin, eine der Aminosäuren, die sowohl in einer reduktiven als auch einer oxidativen Stickland-Reaktion metabolisiert wird (Neumann-Schaal et al., 2015; Kim et al., 2006 und 2005), konnte beim Übergang in die stationäre Phase extrazellulär nicht mehr nachgewiesen werden. Die Produkte wurden am Ende der Kultivierung mit einem Verhältnis von 3:1 für Isocaproat und Isovalerat bestimmt, bezogen auf die eingesetzte Menge Leucin im Medium. Die extrazellulären Verläufe der Metabolite wiesen auf eine komplette Umstellung vom oxidativen zum reduktiven Weg während der exponentiellen Phase hin.

In den oxidativen Stickland-Reaktionen werden die drei verzweigtkettigen Aminosäuren durch die gleichen Enzyme umgesetzt (Dannheim et al., 2017a). Isoleucin wurde annähernd komplett aufgenommen, während die Aufnahme von Valin wesentlich geringer war. Zum letzten Zeitpunkt wurden noch circa 40 % der ursprünglich eingesetzten Menge im Überstand nachgewiesen (Abb. 26). Die Produkte 2-Methylbutanoat und Isobutanoat wurde während der gesamten Kultivierung sekretiert. Die entsprechenden Gene zeigten eine erhöhte Expression in der stationären Phase. Das nicht vollständig abgebaute Isoleucin und Valin in Kombination mit der erhöhten Genexpression in der stationären Phase lässt auf einen Mangel an reduziertem Ferredoxin oder freiem Coenzym A schließen, welches für die Reduktion zum Acyl-CoA benötigt wird. Der Rückgang des Zwischenprodukts Isobutanoyl-CoA und des gemessenen freien CoAs in den Zellen (Anhang A12) unterstützt diese These. Die Proteom- und Transkriptomdaten zeigten einen starken, bis zu 24-fachen Anstieg der für die Pantothenatbiosynthese verantwortlichen Gene, obwohl Pantothenat dem Medium zugesetzt wird. Ebenfalls eine starke Erhöhung, um das bis zu 63-fache, zeigte ein putativer Pantothenattransporter (PanT) in der Membranfraktion des Proteoms. Pantothenat ist eine Vorstufe vom Coenzym A (Leonardi und Jackowski, 2007), das sowohl in den Stickland-Reaktionen als auch im Zentralstoffwechsel benötigt wird (Andersch et al., 1983; Dickert et al., 2000; Kim et al., 2006). Die Enzyme der Coenzym A-Biosynthese waren in der stationären Phase um das bis zu 3,6-fache herunter reguliert (Anhang A15 und A16). Der Rückgang des freien Coenzym A könnte daher die Folge eines Mangels an Pantothenat oder aber von Cystein sein, welches ebenfalls für die Coenzym A-Synthese benötigt wird und bereits in der exponentiellen Phase sowohl intra- als auch extrazellulär nicht mehr nachweisbar war.

Neben Leucin ist Phenylalanin die zweite Aminosäure, die in *C. difficile* sowohl über eine reduktive als auch eine oxidative Stickland-Reaktion metabolisiert wird (Neumann-

Schaal et al., 2015). In der späten stationären Phase akkumulierte Phenylacetat intra- und extrazellulär, passend zur Phenylalaninaufnahme (Abb. 26). Zu den späteren Zeitpunkten (stat2/3) wurde ein moderater Anstieg der Genexpression im gesamten Stoffwechselweg beobachtet. Der Abbau des Phenylalanins über den reduktiven Weg verläuft äquivalent zu dem des Leucins (HadABC, LdhA, AcdB; Abb. 26; Neumann-Schaal et al., 2015). 3-Phenylpropanoat akkumulierte im Überstand zu einem späteren Zeitpunkt als Isocaproat, dem reduktiven Produkt des Leucins. Dies spricht für eine höhere Spezifität des Enzyms für Leucin. Die Produkte des Phenylalaninabbaus wurden in einem Verhältnis von 2:1 für 3-Phenylpropanoat und Phenylacetat am Ende der Kultivierung im Überstand nachgewiesen, bezogen auf die ursprünglich vorhandene Menge Phenylalanin im Medium. Mit Phenylalanin scheinen offensichtlich sowohl die oxidative als auch die reduktive Stickland-Reaktion in der stationären Phase abzulaufen.

Zusammengefasst wurden vor allem Prolin und Leucin in den reduktiven Stickland-Reaktionen und Leucin und Isoleucin in den oxidativen Stickland-Reaktionen favorisiert. Phenylalanin wird erst in der reduktiven Stickland-Reaktion abgebaut, wenn Leucin fast vollständig metabolisiert wurde. In der stationären Phase konnten Umsätze in den oxidativen Stickland-Reaktionen nachgewiesen werden, während diese in den reduktiven Stickland-Reaktionen nur noch für Phenylalanin nachweisbar waren. Im oxidativen Ast wird über Substratkettenphosphorylierung Energie gewonnen, während im reduktiven Ast die Wasserstoff- oder Elektronenüberträger aus der oxidativen Reaktion regeneriert werden (Stickland, 1934). Die Regeneration der Wasserstoff- und Elektronenüberträger scheint in der stationären Phase durch andere Stoffwechselwege zu erfolgen.

3.3.1.2. Änderungen im Zentralstoffwechsel

Die verschiedenen Fermentationsprodukte des Zentralstoffwechsels akkumulierten ab der transienten Phase im Überstand. Ausnahmen bildeten 1-Butanol, das erst ab der frühen stationären Phase nachgewiesen werden konnte, und Acetat, das bereits in der exponentiellen Phase nachgewiesen wurde und ab der transienten Phase nur noch einen geringen Anstieg zeigte. Das intrazelluläre Maximum der meisten Metabolite des Zentralstoffwechsels wurde in der exponentiellen oder transienten Phase detektiert, in der stationären Phase nahmen die relativen Mengen wieder ab (Abb. 27).

Die CoA-Derivate der Butanoat-Bildung wurden in der Metabolomanalyse in der transienten und der frühen stationären Phase in höheren relativen Mengen nachgewiesen. Diese fielen in der späten stationären Phase wieder ab (Abb. 27). Der

metabolische Stofffluss schien sich zu diesem Zeitpunkt, ausgehend vom Pyruvat, vom Acetyl-CoA zum Lactat zu verschieben. Der Rückgang der CoA-Derivate spricht auch hier, wie schon in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben, für einen Mangel an freiem Coenzym A. Da dieser sowohl in den Stickland-Reaktionen als auch dem Zentralstoffwechsel beobachtet werden konnte, wäre dies ein möglicher Grund für den Übergang der Kultur in die stationäre Phase.

In *C. difficile* 630 Δ erm gibt es zwei Lactat-Dehydrogenasen. Eine L-Lactat-Dehydrogenase (Ldh) und eine über die Elektronen-Bifurkation laufende Lactat-Dehydrogenase (CDIF630erm_01319-01312; Dannheim et al., 2017a). Die Ldh zeigte nur sehr geringe Änderung im Transkriptom und Proteom, während bei der zweiten Variante die Expression der entsprechenden Gene um das bis zu 2,8-fache erhöht war (Anhang A15). Pyruvat und Lactat akkumulierten intrazellulär in der stationären Phase, während das Lactat extrazellulär ab der transienten Phase im Überstand nachgewiesen wurde (Abb. 27). Die über Elektronen-Bifurkation laufende Lactat-Dehydrogenase katalysiert unter physiologischen Bedingungen, aufgrund des niedrigen Redoxpotentials des Ferredoxins, die Reaktion vom Lactat zum Pyruvat (Weghoff et al., 2015). Die erhöhten intrazellulären Konzentrationen des Pyruvats und Lactats in der stationären Phase in Zusammenhang mit der erhöhten Genexpression sprechen für einen konzentrationsabhängigen Verlauf der Reaktion, so dass diese hier vom Pyruvat zum Lactat verläuft.

Die L-Lactat-Dehydrogenase katalysierte Fermentation resultiert in der Oxidation eines NADH, während bei der Reaktion der über Elektronen-Bifurkation laufenden Lactat-Dehydrogenase zwei Reduktionsäquivalente oxidiert werden (Weghoff et al., 2015; Buckel und Thauer, 2018b). Bei der Fermentation zu Butanoat werden ebenfalls zwei Reduktionsäquivalente oxidiert. Die Umstellung auf die Fermentation zu Lactat könnte daher auf die Notwendigkeit eines schnelleren Verbrauchs von reduzierenden Äquivalenten oder die begrenzte Verfügbarkeit von freiem CoA (Kapitel 3.3.1.1) zurückzuführen sein.

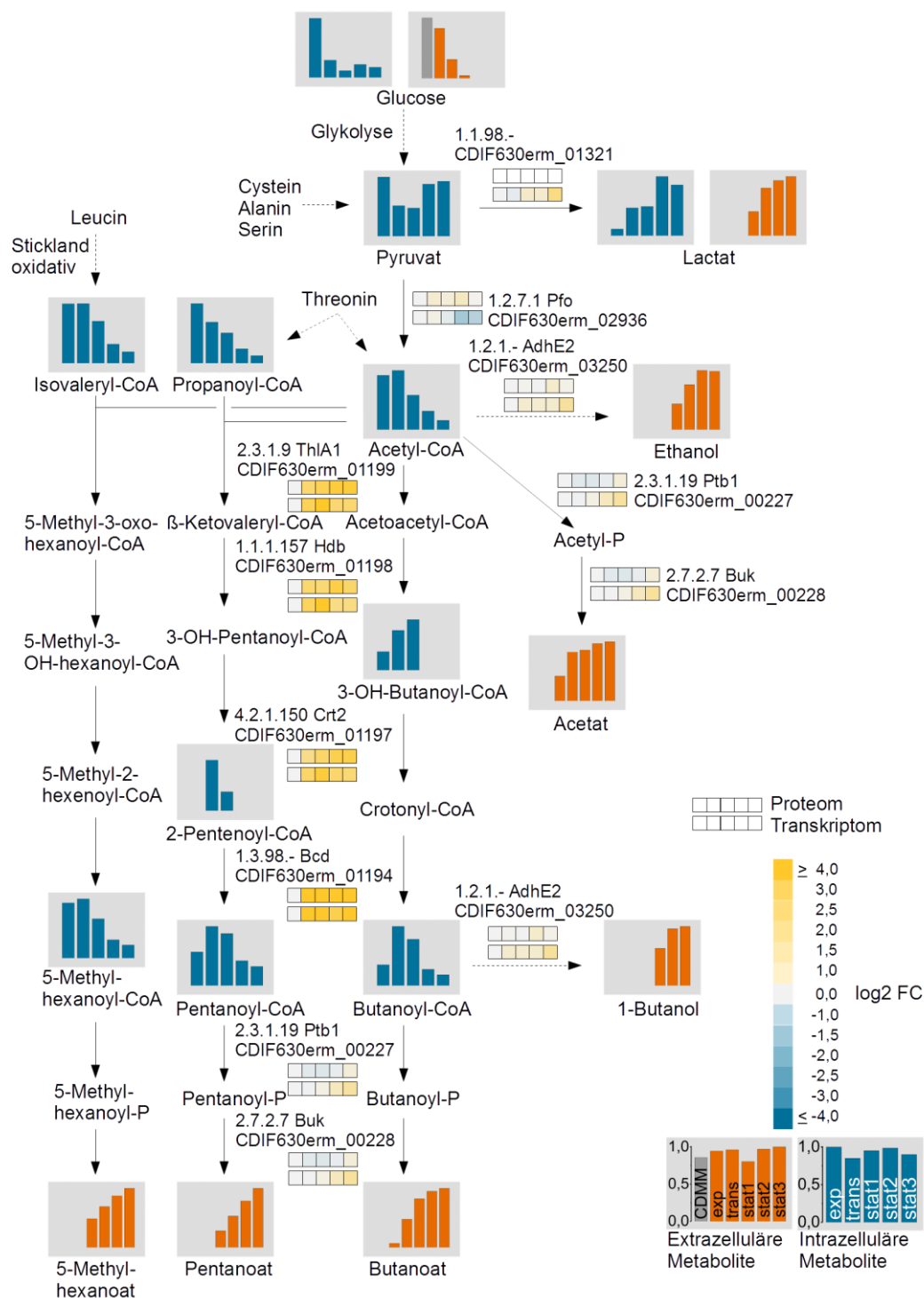


Abb. 27: Zeitaufgelöste Darstellung des Zentralstoffwechsels in *C. difficile* 630Δerm kultiviert in CDMM. Dargestellt sind verschiedene Fermentationen mit den detektierten intra- (blaue Säulen) und extrazellulären Metaboliten (orangene Säulen, grau: Medium) als relative Werte bezogen auf die höchste Konzentration. Die entsprechenden Transkriptom- (unter Quadrat) und Proteomdaten (cytosolisch, oberes Quadrat) zeigen log2 FC (gegen exp) repräsentativer Gene/Proteine. Die Säulen und Quadrate stehen von links nach rechts für die einzelnen Probenahmezeitpunkte exp, trans, stat1, stat2 und stat3. Nicht dargestellte Metabolite wurden nicht detektiert.

3.3.1.3. Einfluss des veränderten Stoffwechsels im Wachstumsverlauf auf die Toxinproduktion von *C. difficile* 630 Δ erm

Toxin A und B wurden zu allen fünf Probenahmezeitpunkten und nach 48 h im Kulturüberstand bestimmt. Beide Toxine konnten in der stationären Phase nachgewiesen werden. Hier akkumulierten sie im Überstand. Nach 48 h wurden $110,9 \pm 8,7$ ng Toxin A und $6,8 \pm 0,5$ ng Toxin B pro Milligramm Biotrockenmasse ermittelt. Dabei zeigten beide Toxine einen leicht unterschiedlichen Verlauf. Die Konzentration an Toxin A nahm vom Punkt stat3 bis zur 48 h-Probe zu, während die Konzentration an Toxin B zwischen den Zeitpunkten stat3 und 48 h keinen signifikanten Anstieg zeigte (Abb. 28). Dieser Unterschied könnte auf die unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen beider Toxine zurückzuführen sein, da das Toxin A in der 10-16-fachen Menge im Vergleich zu Toxin B gemessen wurde.

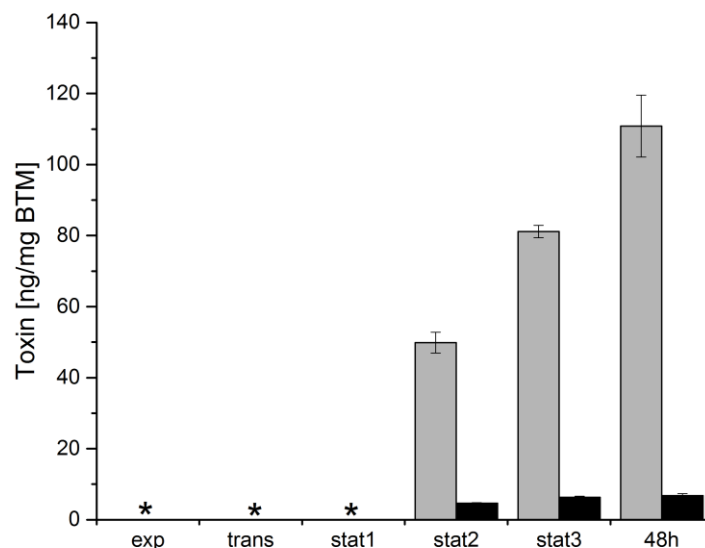


Abb. 28: Extrazelluläre Toxinkonzentration. Toxin A (hellgrau) und Toxin B (dunkelgrau) wurden zu den Probenahmezeitpunkten exp, trans, stat1 – 3 und nach 48 h mittels ELISA bestimmt und auf die Biotrockenmasse bezogen. * kein Toxin nachweisbar.

Auch die Wachstumsphase oder die Wachstumsrate könnten einen Einfluss auf die Toxinproduktion haben, dies wurde aber in früheren Studien nicht bestätigt (Karlsson et al., 1999). Daher wird ein Einfluss des metabolischen Netzwerks auf die Toxinproduktion vermutet. Da sich hier besonders Unterschiede im Energiestoffwechsel wie den Stickland-Reaktionen und dem Zentralstoffwechsel nachweisen ließen, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Toxinproduktion mit den Änderungen im Energiestoffwechsel korreliert.

3.4. Einfluss des Cysteins auf den Virulenz-assoziierten Stoffwechsel

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass eine Cysteinsupplementierung die Toxinproduktion von *C. difficile* reduzieren kann (Karlsson et al., 2008; Dubois et al., 2016). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Um die durch Cystein hervorgerufenen metabolischen Einflüsse auf die Toxinproduktion analysieren zu können, wurde der im Kapitel 3.3 beschriebene Versuch einmal ohne Cystein (-Cys) und einmal mit einer erhöhten Cysteinmenge von 2 g/L im Medium (+Cys) durchgeführt und mit der Referenzkultivierung (0,5 g/L Cystein) verglichen. Die Proben wurden entsprechend der Referenzkultivierung in der exponentiellen Phase, bei $\frac{1}{2}$ OD_{max} (exp), in der transienten Phase (trans), am Anfang der stationären Phase (stat1) und zweimal in der späteren stationären Phase (stat2: stat1 + 5 h; stat3: stat1 + 10h) genommen.

Unter der Annahme, dass die komplette Glucose, Serin, Threonin und Cystein für den Aufbau von Biomasse verwendet werden, und Alanin nicht eingerechnet wird, da es in den Kultivierungen bis zur stationären Phase sekretiert wird, steht im Medium ohne Cystein circa 18 % weniger und im Medium mit 2 g/L Cystein 54 % zusätzlicher Kohlenstoff für den Biomasseaufbau zur Verfügung, im Vergleich zum CDMM.

Dennoch führten sowohl die Kultivierung im Medium ohne Cystein als auch die mit einer erhöhten Menge an Cystein im Medium zu einem schlechteren Wachstum von *C. difficile* 630Δ*erm*. Die maximale Biotrockenmasse ist um 29 % ohne Cystein und um 39 % bei 2 g/L Cystein im Medium gesunken. Auch die Wachstumsrate ist um 28 % in der Kultivierung ohne Cystein bzw. mit 2 g/L Cystein im Medium im Vergleich zur Kultivierung im CDMM gefallen (Abb. 29).

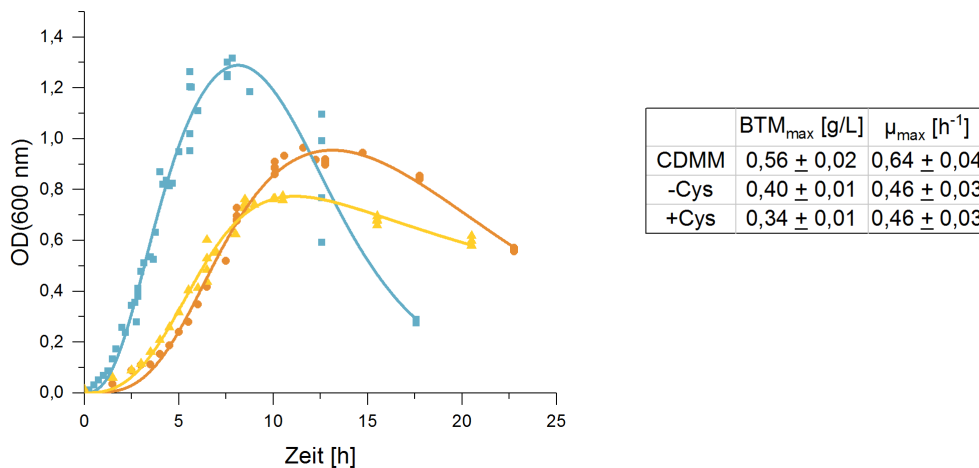


Abb. 29: Wachstumskurven von *C. difficile* 630Δerm kultiviert mit verschiedenen Cysteinkonzentrationen. Dargestellt sind die Wachstumskurven in CDMM (0.5 g/L Cystein, blau), ohne Cystein (-Cys, orange) und mit 2 g/L Cystein (+Cys, gelb) im Medium mit der entsprechenden maximalen Biotrockenmasse BTM_{max} und der maximalen Wachstumsrate μ_{max}. Kultiviert wurde in 1 L-Afnorflaschen und die optische Dichte wurde photometrisch bei 600 nm in Küvetten bestimmt. Die Kurven wurden gemäß der biphasischen Hill-Gleichung interpoliert (OriginPro 2016 Software).

In allen drei Kultivierungen wurde die extrazelluläre Toxinkonzentration zu allen fünf Probenahmezeitpunkten und nach 48 h Kultivierungszeit bestimmt und bezogen auf die Biotrockenmasse miteinander verglichen. In den zellfreien Überstandproben, die in der exponentiellen und transienten Phase der drei Kultivierungen genommen wurden, konnte kein Toxin nachgewiesen werden. Ab dem Zeitpunkt stat2 wurde in allen drei Kultivierungen sowohl Toxin A als auch Toxin B detektiert. Insgesamt wurde in den Überstandproben der Kultivierungen, die mit steigendem Cysteingehalt im Medium kultiviert wurden, weniger Toxin detektiert. Nach 48 h wurde im Vergleich zum CDMM eine um das 18-fache verringerte Konzentration an Toxin A und um das 9-fache verringerte Menge an Toxin B in den Überstandproben der Kultivierung mit 2 g/L Cystein nachgewiesen. In den Überstandproben der Kultivierung ohne Cystein im Medium wurde nach 48 h die 2,5-fache Menge Toxin A und eine um das 2,6-fache erhöhte Konzentration an Toxin B im Vergleich zur Kultivierung im CDMM detektiert (Abb. 30).

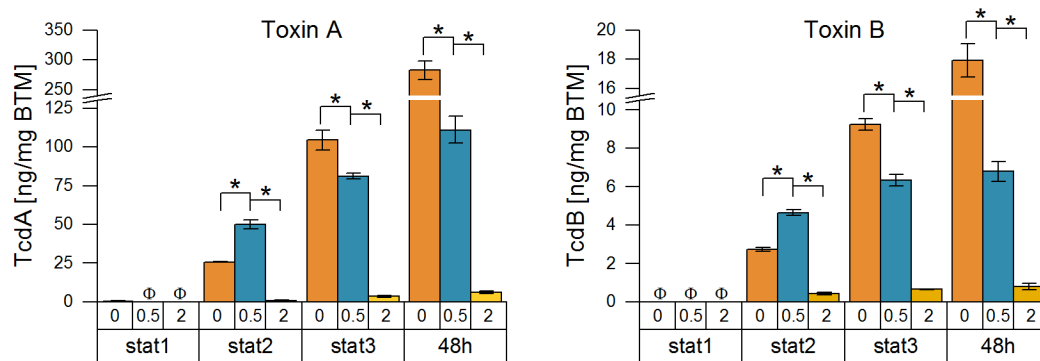


Abb. 30: Extrazelluläres Toxin A und Toxin B in Kultivierungen von *C. difficile* 630 Δ erm mit verschiedenen Cysteinkonzentrationen. Die Toxine wurden zu den Probenahmezeitpunkten stat1 – 3 und nach 48 h in CDMM (blau), ohne Cystein (orange) und mit 2 g/L Cystein im Medium (gelb) mittels ELISA bestimmt und auf die Biotrockenmasse bezogen. Φ kein Toxin nachweisbar, * signifikante Änderung mit p -Wert < 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit Korrektur nach Benjamini/Hochberg.

3.4.1. Änderungen in der Aminosäure- und Glucoseaufnahme

Die Kultivierung ohne Cystein im Medium führte zu einem erhöhten Verbrauch der von *C. difficile* 630 Δ erm in den Stickland-Reaktionen favorisierten Aminosäuren. Neben Prolin und Leucin war auch Glycin in der transienten Phase vollständig aufgenommen worden (Abb. 31 A).

Von den Aminosäuren, die über die oxidativen Stickland-Reaktionen abgebaut werden, war Isoleucin ebenfalls in der transienten Phase vollständig aufgenommen worden und Valin war am Ende der Kultivierung nur noch mit $4,4 \pm 0,6$ % der ursprünglichen Menge im Überstand nachweisbar (Abb. 31 A). Alanin wurde in dieser Kultivierung bis zum Übergang in die stationäre Phase sekretiert, anschließend aber wieder aufgenommen. Phenylalanin und Tyrosin zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Bei den über den Zentralstoffwechsel abgebauten Aminosäuren zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der Aufnahme (Abb. 31 B). Ohne Cystein im Medium waren Threonin und Serin bereits in der exponentiellen Phase fast vollständig aufgenommen worden. Glucose zeigte eine ähnliche Aufnahme wie im CDMM.

Im Vergleich der Aminosäureaufnahme am Ende der Kultivierung (stat3) zwischen der in CDMM gewachsenen Zellen mit denen, die ohne Cystein kultiviert wurden, zeigte sich zusätzlich eine stark erhöhte Aufnahme von Methionin in den ohne Cystein kultivierten Proben (Tab. 12).

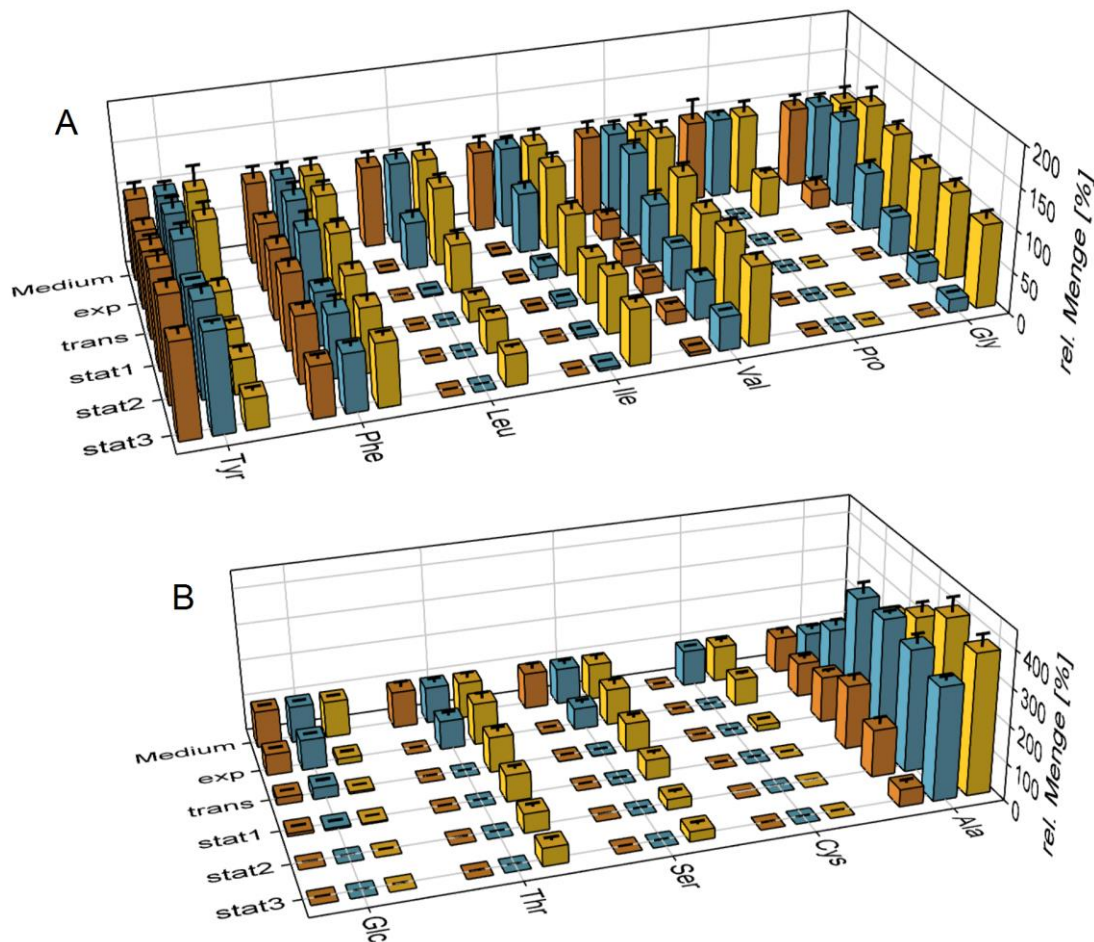


Abb. 31: Zeitaufgelöstes Aufnahmeprofil der in den Stickland-Reaktionen (A) und im Zentralstoffwechsel (B) verwerteten Aminosäuren und Glucose. Die Aminosäuren wurden als OPA/FMOC-Derivate aus zellfreien Kulturüberständen aus CDMM (blau), ohne Cystein (orange) und mit 2 g/L Cysteinsupplementierung (gelb) mittels HPLC-FLD bestimmt. Glucose wurde mittels GC-MS analysiert. Die relative Menge [%] bezieht sich auf die im jeweiligen Medium bestimmte Anfangskonzentration. Relative Werte sind im Anhang A17 zu finden.

Bei der Kultivierung mit 2 g/L Cystein im Medium war Cystein noch bis in die transiente Phase im Überstand nachweisbar. Threonin und Serin wurden beide zum Teil aufgenommen, waren aber am Ende der Kultivierung noch mit $45,8 \pm 9,6 \%$ und $25,7 \pm 6,9 \%$ nachweisbar (Abb. 31 B). Die geringe Aufnahme dieser beiden Aminosäuren kann eine Reduzierung der Biomasse erklären, jedoch nicht in dem vorliegenden Ausmaß. Von den im CDMM favorisierten Aminosäuren in den Stickland-Reaktionen wurde nur Prolin komplett aufgenommen (Abb. 31 A). Die Aminosäuren Glycin, Leucin, Isoleucin und Valin zeigten Restkonzentrationen von 35,3 bis 100,6 %. Dagegen wurde Arginin komplett und Tyrosin zu 63,8 % aufgenommen (Tab. 12). Beide Aminosäuren zeigten in den anderen Kultivierungen mit weniger Cystein im Medium kaum

Aufnahme.

Glucose zeigte eine schnellere Aufnahme als in den beiden anderen Medien, in der transienten Phase konnten nur noch $4,9 \pm 0,2$ % der ursprünglich vorhandenen Menge nachgewiesen werden (Abb. 31 B). Die Glucose könnte aufgrund der kaum genutzten Stickland-Reaktionen als Alternative zur Energiegewinnung oder für den Aufbau von Biomasse verwendet werden. Das Weiteren wird sie zur Bildung des Exopolysaccharids genutzt (Dannheim et al., 2017b).

Tab. 12: Prozentuale Konzentration ausgewählter Aminosäuren im Überstand am Ende der Kultivierung (stat3), bezogen auf die Anfangskonzentration im Medium.

Aminosäure	CDMM [%]	-Cys [%]	+Cys [%]
Arginin	$98,1 \pm 2,5$	$101,4 \pm 7,3$	-
Aspartat	$31,3 \pm 1,3$	$37,1 \pm 2,8$	$94,5 \pm 7,5$
Glutamat	$100,9 \pm 4,8$	$134,3 \pm 10,4$	$109,6 \pm 8,3$
Histidin	$141,6 \pm 3,2$	$185,8 \pm 13,1$	$97,3 \pm 8,6$
Lysin	$78,0 \pm 9,9$	$97,1 \pm 14,7$	$93,5 \pm 10,9$
Methionin	$53,2 \pm 3,6$	$5,0 \pm 2,0$	$82,7 \pm 6,7$

3.4.2. Änderungen im Stoffwechsel von *C. difficile* 630 Δ erm kultiviert ohne Cystein und Zusammenhang zur Toxinproduktion

In den Überstandsproben der Kultivierung ohne Cystein im Medium konnten die Produkte der Stickland-Reaktionen und der Fermentationen im Zentralstoffwechsel passend zu der Aminosäureaufnahme nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren im Vergleich zum CDMM zu allen Zeitpunkten leicht erhöht, nur Isocaproat und Acetat zeigten sehr ähnliche Verläufe. Das Zwischenprodukt, 2-Hydroxyisocaproat, wurde in einer geringeren Konzentration zu allen Zeitpunkten nachgewiesen. Passend zu der erhöhten Aufnahme des Methionins wurde 4-(Methylthio)butanoat bereits in der exponentiellen Phase im Überstand detektiert und zeigte eine Zunahme bis in die späte stationäre Phase (Abb. 32).

Bei den Produkten des Zentralstoffwechsels zeigten sich ähnliche Konzentrationen in den Proben, die im CDMM und ohne Cystein im Medium kultiviert wurden. In den zellfreien Überstandsproben der Kultivierungen ohne Cystein waren Pentanoat und 5-Methylhexanoat zum Zeitpunkt stat3 leicht erhöht, während in den Proben, die im CDMM kultiviert wurden, Ethanol und 1-Butanol höhere Konzentrationen zeigten (Abb. 32). Dies könnte auf eine unterschiedliche Regulation der Alkoholdehydrogenase zurückzuführen sein.

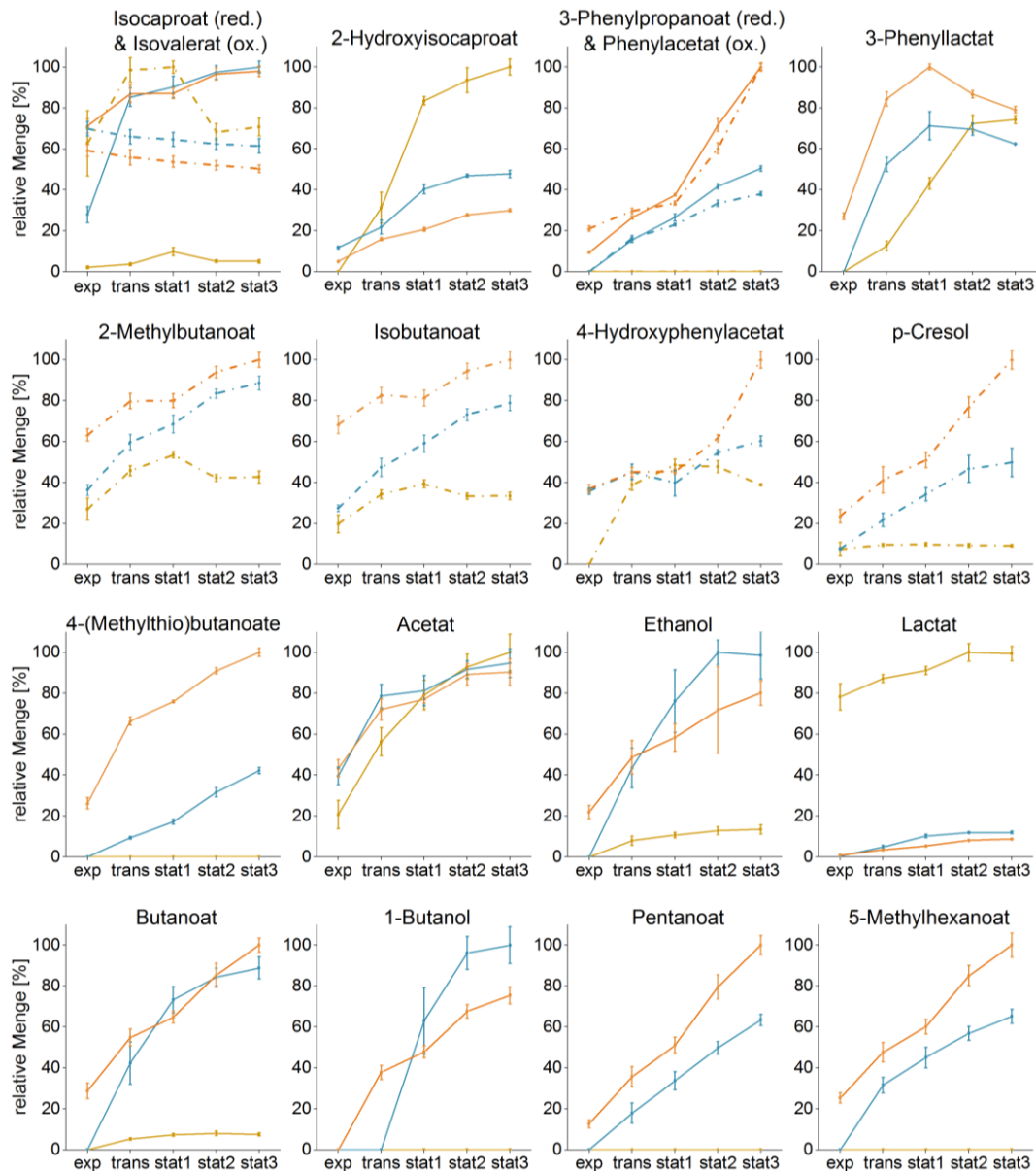


Abb. 32: Extrazelluläre Produkte und Intermediate der Stickland-Reaktionen und der Fermentationen im Zentralstoffwechsel von *C. difficile* 630 Δ erm kultiviert mit verschiedenen Cysteinkonzentrationen. Kultiviert wurde in CDMM (blau), ohne Cysteinsupplementierung (orange) und mit 2 g/L Cystein im Medium (gelb). Die Produkte des Zentralstoffwechsels (Linie), der reduktiven Stickland-Reaktionen (Linie) und der oxidativen Stickland-Reaktionen (gestrichelt) wurden im zeitlichen Verlauf über die einzelnen Probenahmezeitpunkte exp, trans und stat1-3 aufgetragen. Die relative Menge [%] bezieht sich auf die jeweils höchste Konzentration innerhalb der drei Kulturen. Einzelwerte sind im Anhang A18 und A19 zu finden.

Die erhöhte Toxinkonzentration in den Überstandspuren der Kultivierung ohne Cystein im Medium, im Vergleich zur Kultivierung im CDMM, könnte mit dem erhöhten Verbrauch der Aminosäuren in Zusammenhang stehen. Zu Beginn der stationären Phase

(stat1) waren alle von *C. difficile* 630 Δ *erm* favorisierten Aminosäuren in der Kultivierung ohne Cystein im Medium fast vollständig aufgebraucht. Nur Valin konnte noch mit $20,6 \pm 1,4$ % und Glucose mit $7,5 \pm 1,1$ % im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 31). In der stationären Phase dieser Kultivierung wurde Alanin aufgenommen und metabolisiert. In dieser Kultivierung geht *C. difficile* 630 Δ *erm* vermutlich aufgrund eines Energiemangels in die stationäre Phase über, wodurch auch die hohe Toxinproduktion induziert werden könnte. Eine Regulation könnte über das Regulatorprotein CodY erfolgen, über welches der Nährstoffgehalt des umgebenden Mediums überwacht wird. Dies erfolgt über die intrazellulären Mengen an GTP und verzweigtkettigen Aminosäuren (Dineen et al., 2010). CodY bindet an die Promotor-Region von *tcdR*, wodurch die Expression der Toxingene unterdrückt wird (Dineen et al., 2007). Intrazellulär sind Leucin und Isoleucin zum Zeitpunkt stat2 nicht mehr nachweisbar und auch Valin hatte zu diesem Zeitpunkt stark abgenommen (Abb. 31 A). Im CDMM waren zu diesem Zeitpunkt intrazellulär noch höhere Mengen Isoleucin und Valin nachweisbar. Im CDMM könnte CodY daher die Expression der Toxingene negativ regulieren, da intrazellulär ein ausreichender Spiegel an verzweigtkettigen Aminosäuren in der stationären Phase vorhanden ist. Dieses ist in der Kultivierung im Medium ohne Cystein in der stationären Phase nicht der Fall, wodurch keine Regulation von CodY induziert wird und die Toxinproduktion steigt.

3.4.3. Änderungen im Stoffwechsel von *C. difficile* 630 Δ *erm* kultiviert mit 2 g/L Cystein und Zusammenhang zur Toxinproduktion

Die Produkte der Stickland-Reaktionen wurden im Vergleich zur Kultivierung im CDMM in niedrigeren Konzentrationen in den Überstandproben der Kultivierung mit 2 g/L Cystein im Medium nachgewiesen (Abb. 32). Isovalerat zeigte nur leicht geringere Konzentrationen, während Isocaproat nur bis maximal 10 % der im CDMM detektierten Menge nachgewiesen wurde. Dafür akkumulierte das Zwischenprodukt, 2-Hydroxyisocaproat, im Überstand der Kultur mit 2 g/L Cystein im Medium. Auch das Zwischenprodukt der reduktiven Stickland-Reaktion von Phenylalanin, 3-Phenyllactat, akkumulierte im Medium. Beide Stickland-Produkte von Phenylalanin, 3-Phenylpropanoat und Phenylacetat, konnten nicht nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten alle Stickland-Produkte der Kultivierung mit 2 g/L Cystein im Medium nur sehr geringe extrazelluläre Zunahmen ab der transienten Phase.

Die Produkte der Buttersäuregärung konnten, bis auf eine um das bis zu 12-fache

verringerte Konzentration an Butanoat im Vergleich zur Kultivierung im CDMM, in den Überstandproben der Kultivierung mit 2 g/L Cystein nicht nachgewiesen werden. Auch Ethanol wurde nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen. Acetat zeigte extrazellulär einen ähnlichen Verlauf wie in den beiden anderen Kultivierungen. Nur Lactat war um das bis zu 32-fache im Vergleich zum CDMM im Überstand erhöht.

Durch den Abbau von Cystein wird Schwefelwasserstoff gebildet (Dubois et al., 2016), wodurch nach der Sekretion unlösliches Eisensulfid gebildet wird. Eisen ist durch sein Redoxpotential ein für fast alle Mikroorganismen notwendiges Mikroelement, da es unter anderem in vielen Proteinen als Cofaktor oder an Reaktionen als Elektronenüberträger beteiligt ist. Eine zu hohe Eisenkonzentration kann jedoch auch zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen, was zu einer Schädigung von zellulären Schlüsselkomponenten durch oxidativen Stress führen kann (Andrews et al., 2003). Um ein geeignetes Gleichgewicht an Eisen zu halten, regulieren Bakterien die Eisenaufnahme und Verwertung auf Transkriptionsebene. In den meisten Bakterien wird die Eisenaufnahme durch den sogenannten „Ferric uptake Regulator“ (Fur) reguliert, welcher auch in *C. difficile* nachgewiesen wurde (Troxell und Hassan, 2013; Ho und Ellermeier, 2015). Neben dem Eisentransport reguliert Fur Prozesse im Energiemetabolismus, dem Redoxpotential und der flagellaren Chemotaxis (Escobar et al., 1999; Vasileva et al., 2012). In komplexen Medium wurde die Induktion des Fur-Regulons durch Cystein auf Transkriptomebene nachgewiesen (Dubois et al., 2016).

Eine Möglichkeit der Eisenaufnahme in Bakterien ist die Bildung von Siderophoren, die auch bei niedrigen Eisenkonzentrationen hoch sensitiv ist. Siderophore werden von Bakterien sekretiert, wo sie Komplexe mit Eisen-Ionen, auch Fe^{3+} , bilden und diese anschließend in die Zelle transportieren (Huang und Wilks, 2017; Zughaier und Cornelis, 2018). Eine Vorstufe für Siderophore ist Spermidin (Peterson et al., 1980), welches intrazellulär in den mit 2 g/L Cystein im Medium kultivierten Zellen nachgewiesen werden konnte (Anhang A19). Für die Spermidinbiosynthese wird Arginin verwendet, was die erhöhte Aufnahme dieser Aminosäure in der Kultivierung mit 2 g/L Cystein im Medium erklärt.

Die Isocaproyl-CoA-Dehydrogenase in der reduktiven Stickland-Reaktion des Leucins und Phenylalanins, die 3-Methyl-2-oxobutanoate-Dehydrogenase des oxidativen Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren und die Indolpyruvat-Oxidoreduktase des oxidativen Abbaus der aromatischen Aminosäuren nutzen als Elektronenüberträger Ferredoxin (Mai und Adams, 1994; Kim et al., 2004). Ebenfalls Ferredoxin-abhängig ist die

Reaktion der Pyruvatsynthase, die in der oxidativen Stickland-Reaktion von Alanin bzw. im Zentralstoffwechsel die Reaktion des Pyruvats zum Acetyl-CoA katalysiert (Evans et al., 1966). Die entsprechenden Produkte der reduktiven Reaktionen konnten nicht (3-Phenylpropanoat) bzw. in sehr geringen Konzentrationen (Isocaproat) im Vergleich zu den anderen Kultivierungen nachgewiesen werden. Die Zwischenprodukte 2-Hydroxyisocaproat und 3-Phenyllactat akkumulierten im Überstand (Abb. 32). Durch den Eisenmangel wird demnach nicht der komplette Stoffwechselweg heruntergefahren. Dies konnte auch in einer Studie mit Transkriptomdaten im Vergleich von *C. difficile* 630 Δ erm mit viel und wenig Eisen im Medium und dem Vergleich einer *fur*-Mutante gegen den Wildtyp gezeigt werden (Berges et al., 2018). Die Expression der Gene *hadABC1* (CDIF630erm_00522-00526) und *acdB* (CDIF630erm_00527), die für die Enzyme der Reaktionen von der 2-Hydroxysäure bis zur Carbonsäure codieren, war stark verringert, während für die Transaminase und die (R)-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase keine Regulation detektiert wurde (Berges et al., 2018). Durch die Reaktion bis zur 2-Hydroxysäure wird ein NADH oxidiert. Die oxidativen Produkte konnten in niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu den beiden anderen Kultivierung im Überstand nachgewiesen werden. In der Kultivierung im CDMM konnte gezeigt werden, dass die oxidativen Stickland-Reaktionen bereits in der frühen exponentiellen Phase ablaufen (Kapitel 3.3.1.1). Die Stagnation der Akkumulation im Überstand in der stationären Phase der Kultivierung mit 2 g/L Cystein im Medium deutet darauf hin, dass der Eisenmangel bzw. die Regulation durch Fur die Reaktionen zu diesem Zeitpunkt verhinderte, wodurch nur geringe Mengen der Produkte gebildet werden konnten.

Der Glycin-Reduktase-Komplex in *C. difficile* nutzt Thioredoxin als Elektronenüberträger (Graentzdoerffer et al., 2001; Jackson et al., 2006), die Elektronen werden über verschiedene Redoxzustände von Cysteingruppen übertragen. Trotzdem scheint auch diese Reaktion nicht abzulaufen, da keine Glycinaufnahme während der Kultivierung nachgewiesen werden konnte. Die sehr ähnlichen Acetatkonzentrationen in allen drei Kultivierungen deuten darauf hin, dass Glycin in *C. difficile* 630 Δ erm zu einem Großteil nicht zum Acetat abgebaut wird, sondern über das Acetyl-CoA in den Zentralstoffwechsel gelangt.

Im Zentralstoffwechsel wird in der Reaktion von Crotonyl-CoA zu Butanoyl-CoA ebenfalls Ferredoxin als Elektronenakzeptor verwendet (Li et al., 2008), weshalb die Reaktion aufgrund des Eisenmangels nicht stattfinden kann. Auch die Pyruvatsynthase, die die Reaktion von Pyruvat zum Acetyl-CoA katalysiert, ist Ferredoxin-abhängig

(Evans et al., 1966). Mit der Formiat-C-Acetyltransferase existiert jedoch ein zweites Eisen-unabhängiges Enzym, welches die reversible Reaktion von Pyruvat und Coenzym A zu Formiat und Acetyl-CoA katalysiert. Diese scheint aufgrund der geringen Konzentration an Ethanol, welches durch die Oxidation eines NADH über die Alkoholdehydrogenase aus Acetyl-CoA gebildet wird, nur in geringen Mengen vorhanden zu sein.

Daher verlief die Hauptreaktion im Zentralstoffwechsel vom Pyruvat zum Lactat. Eine Analyse des Lactats zum letzten Zeitpunkt aller drei Kultivierungen (stat3) mittels eines Enzymassays ergab eine sehr hohe Konzentration von $1,09 \pm 0,03$ g/L L-Lactat und $0,038 \pm 0,002$ g/L D-Lactat im Überstand der mit Cystein supplementierten Kultur. In den Überständen der beiden anderen Kultivierungen konnte D-Lactat in Konzentrationen von $0,142 \pm 0,005$ g/L im CDMM und $0,099 \pm 0,003$ g/L in der Kultivierung ohne Cystein im Medium nachgewiesen werden. L-Lactat wurde in diesen Kulturen nicht gebildet. In der Kultivierung mit 2 g/L Cystein scheint die L-Lactat-Dehydrogenase (Ldh) exprimiert zu werden, während in CDMM, wie bereits in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben, die über Elektronen-Bifurkation laufende Lactat-Dehydrogenase (CDIF630erm_01319-01321) in der stationären Phase stärker exprimiert wurde. Ein Einfluss des Eisens auf die L-Lactat-Dehydrogenase, reguliert durch Fur, wurde bereits für *Clostridium acetobutylicum* beschrieben (Vasileva et al., 2012). Die Elektronen-Bifurkation ist ebenfalls an eine Oxidation von Ferredoxin gekoppelt. Im Gegensatz zur L-Lactat-Dehydrogenase kann diese Reaktion unter physiologischen Bedingungen aufgrund des niedrigen Redoxpotentials des Ferredoxins konzentrationsabhängig auch vom Lactat zum Pyruvat ablaufen (Weghoff et al., 2015). In der Reaktion vom Pyruvat zum Lactat über die L-Lactat-Dehydrogenase wird ein NADH zu NAD^+ oxidiert. Dadurch könnten die in den oxidativen Stickland-Reaktionen reduzierten Reduktionsäquivalente wieder bereitgestellt werden.

Aufgrund der dargestellten Ergebnisse ist die Reduzierung des Toxins durch Cystein direkt oder indirekt auf den daraus resultierenden Eisenmangel zurückzuführen. Durch das Fehlen des Eisens als Cofaktor in Proteinen, insbesondere als Elektronenüberträger, wird die Energieproduktion durch die Stickland-Reaktionen und im Zentralstoffwechsel in *C. difficile* 630 Δ erm sehr stark eingeschränkt. Auch der Biomasseaufbau wird dadurch gestört. In Versuchen mit einer Cysteinsupplementierung von 10 mM (entspricht 1,2 g/L) und der Deletion eines Sigma Faktors (SigL) in *C. difficile* 630 Δ erm, welche zu einer geringeren H_2S -Produktion führte, wurde eine Erhöhung der Transkripte für die

Toxingene *tcdA*, *tcdB* und *tcdR* im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Dubois et al., 2016). Der menschliche Organismus enthält insgesamt circa 5 g Eisen, wovon täglich circa 0,5 - 1 mg verloren gehen (Cassat und Skaar, 2013). Bei einer normalen westlichen Ernährungsweise liegt die Eisenmenge im Darm bei circa 100 mg/g Darminhalt (Pizarro et al., 1987; Lund et al., 1999). Bestimmte Substanzen in Nahrungsmitteln, wie Tannine und Coffein aus Tee oder Kaffee, aber auch Polyphenole, die in vielen Obst- und Gemüsesorten enthalten sind, bilden unlösliche Eisenkomplexe, wodurch das Eisen von den Mikroorganismen im Darm nicht aufgenommen werden kann (Disler et al., 1975; Morck et al., 1983; Ma et al., 2011). Durch steigende pH-Werte im Duodenum und Dünndarm sinkt die Löslichkeit des Eisens durch die Bildung der oxidierten Form bei vorhandenem Sauerstoff (Miller und Berner, 1989). Des Weiteren bildet der menschliche Organismus Proteine wie Ferritin, Transferrin, Lactoferrin und Haemoproteine, die freies Eisen binden, um dieses für schädliche Mikroorganismen unzugänglich und für den menschlichen Organismus verfügbar zu machen (Cassat und Skaar, 2013; Kortman et al., 2014). In einem durch 2,2'-Bipyridin eisenfreien Medium konnte das Wachstum von *C. difficile* durch verschiedene Eisensalze und Ferritin angeregt werden (Cernat und Scott, 2012).

Insgesamt wird die Verfügbarkeit von Eisen für *C. difficile* im menschlichen Host gering, aber vorhanden, sein. Durch die mit CDI oft assoziierte Antibiotikagabe sinkt die Zahl der um das Eisen konkurrierenden Bakterien. Eine Einschränkung der Eisenverfügbarkeit für *C. difficile* im menschlichen Host zur Reduktion der Toxinproduktion und der Kolonisation der Bakterien bei einer Erkrankung mit CDI wäre nur für eine kurze Zeit bzw. durch die Zufuhr von für den menschlichen Host aber nicht für *C. difficile* verfügbarem Eisen möglich, um den menschlichen Organismus nicht weiter zu schädigen.

3.5. Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und Stoffwechsel in verschiedenen *C. difficile* Isolaten

In folgendem Kapitel 3.5 werden durchgeführte Toxinanalysen mit im *International Journal of Microbiology* (Riedel et al., 2017) publizierten Wachstumskurven und Exometabolomdaten in Zusammenhang gebracht.

Um einen Überblick über die Unterschiede im Stoffwechsel der verschiedenen Stämme und einen eventuellen Zusammenhang zwischen Klade, Toxinproduktion und Stoffwechsel zu erhalten, wurden 17 Stämme aus den Kladen 1 bis 5 mit verschiedenen

Herkunftsregionen (Deutschland, Ghana, Indonesien) sowie zwei Referenzstämme (630 Δ erm und R20291) ausgewählt (Kapitel 2.3, Riedel et al., 2017). Dabei wurde die Konzentration an sekretiertem Toxin in Kultivierungen in Caseinhydrolysat-Medium supplementiert mit 2 g/L Glucose (CDMM) bestimmt und mit der Aminosäureaufnahme und produzierten Fermentationsprodukten in der stationären Wachstumsphase (Riedel et al., 2017) in Zusammenhang gebracht.

3.5.1. Wachstum und Toxinbildung der verschiedenen *C. difficile* Stämme

Das Wachstum der verschiedenen Stämme unterschied sich zum Teil sehr stark (Abb. 33). Die maximale optische Dichte variierte zwischen $0,72 \pm 0,01$ mit einer maximalen Wachstumsrate von $0,25 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ beim Stamm DSM 27147 und einer maximalen optischen Dichte von $1,53 \pm 0,02$ und einer maximalen Wachstumsrate von $0,74 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ beim Stamm DSM 29020.

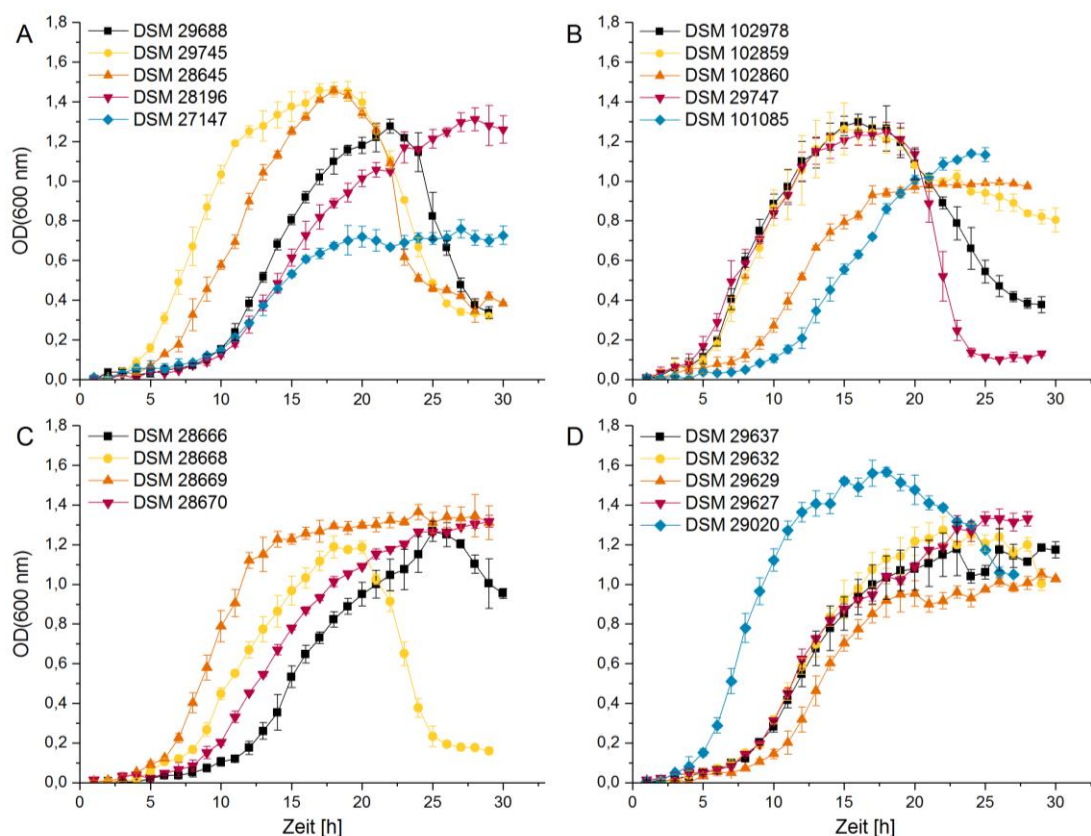


Abb. 33: Wachstum der 19 verschiedenen *C. difficile* Isolate in CDMM. A und B: Referenzstämme DSM 28645 (630 Δ erm) und DSM 27147 (R20291), sowie Stämme aus Deutschland; C: Stämme aus Ghana; D: Stämme aus Indonesien. Das Wachstum wurde in Hungate-Glasröhrchen mittels eines WPA CO8000 Zelldensitometers in drei unabhängigen Kultivierungen bestimmt (zusammen mit Mareike Berges (AG Jahn, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig) und Meina Neumann-Schaal).

Einige der Stämme zeigten einen starken Abfall der optischen Dichte in der stationären Phase, die wie in Kapitel 3.2.1 und 3.2.3 beschrieben, auf einer Zellaggregation bzw. Biofilmbildung beruhen (Tab. 13). In Kapitel 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass in Kulturen von *C. difficile* 630 Δ *erm* ohne Zellaggregation eine höhere extrazelluläre Toxinkonzentration vorliegt.

Tab. 13: Zellaggregation und Toxinbildung der Stämme mit vorhandenen Toxingenen. Aufgrund der Zellaggregation konnte ein starker Rückgang (++) oder ein leichter (+) Rückgang der optischen Dichte während der Kultivierungszeit von 30 h nachgewiesen werden. In einigen Stämmen zeigte sich kein Rückgang (- -) der optischen Dichte bzw. konnte dieser aufgrund des langsamen Wachstums innerhalb von 30 h nicht festgestellt werden (-). Das extrazelluläre Toxin wurde nach 48 h mittels ELISA bestimmt und auf die maximale Biotrockenmasse bezogen.

Stamm	Zellaggregation	Extrazelluläres Toxin (ja/nein)
DSM 29745	++	ja
DSM 29632	+	ja
DSM 28668	++	ja
DSM 28645 (630 Δ <i>erm</i>)	++	ja
DSM 28196	-	ja
DSM 27147 (R20291)	- -	ja
DSM 102978	++	nein
DSM 102859	+	nein
DSM 102860	- -	ja
DSM 29627	-	ja
DSM 29747	++	ja
DSM 29020	+	ja

Die Konzentration der extrazellulären Toxine A und B wurde mittels ELISA nach 48 h aus drei unabhängigen Kultivierungen bestimmt und auf die maximale Biotrockenmasse der einzelnen Stämme bezogen, um eine Vergleichbarkeit zu erlangen (Abb. 34). Hier konnten die Toxine passend zu dem Vorhandensein der Gene in den Stämmen nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen Klade und Toxinkonzentration konnte nicht festgestellt werden. In den Stämmen DSM 102978 und DSM 102859 konnte kein Toxin nachgewiesen werden, obwohl die entsprechenden Gene vorhanden sind. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: Zum einen könnte die Expression der Toxingene gering sein oder das Toxin wird in diesen Isolaten schlecht sekretiert. Zum anderen könnten Unterschiede in der Stabilität der Toxine vorliegen oder der ELISA

bindet die Toxine der verschiedenen Isolate unterschiedlich gut, falls diese Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufweisen.

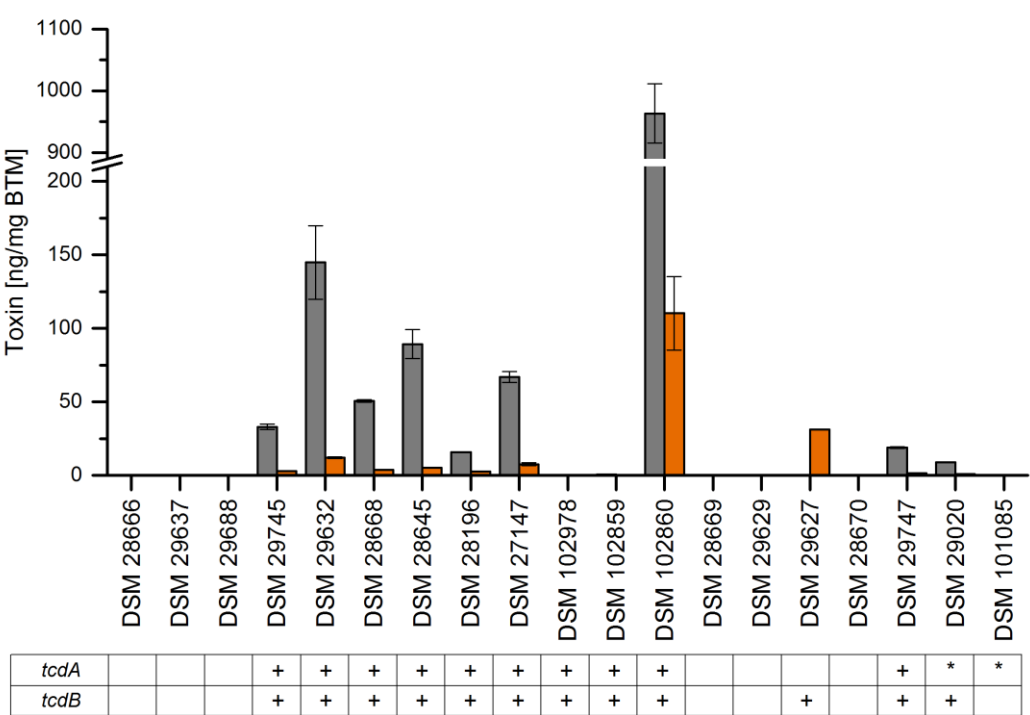


Abb. 34: Extrazelluläre Konzentrationen an Toxin A (grau) und Toxin B (orange) in den 19 *C. difficile* Isolaten nach 48 h Kultivierung. Die Toxinkonzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt und auf die maximale Biotrockenmasse. Die vorhandenen Toxingene *tcdA* (Toxin A) und *tcdB* (Toxin B) wurden in der Tabelle angegeben: + positiv, * Pseudogen.

Im Vergleich zeigen die Aminosäuresequenzen von Toxin A der toxischen Stämme keinen Unterschied. Die Sequenzen von Toxin B zeigen in 11 von 13 Stämmen keine Unterschiede. In Stamm DSM 29627 ist ein zusätzliches Lysin an Position 308 vorhanden, Stamm DSM 29747 zeigt eine Glycindeletion an Position 2101. In beiden Stämmen konnte Toxin B im ELISA detektiert werden. Im Stamm DSM 29747 wurde zwar nur eine geringe Konzentration an Toxin B mit $1,43 \pm 0,04$ ng/mg BTM nachgewiesen, diese passt aber zur detektierten Konzentration an Toxin A, welches in der 13-fachen Menge von Toxin B bestimmt wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Antikörper des ELISA auf die Toxine ansprechen und dass auch die Stabilität der Toxine gleich sein sollte. Die Unterschiede in der Toxinkonzentration können daher nicht auf Stabilitätsunterschiede der Toxine oder Bindungsprobleme im ELISA zurückgeführt werden.

Die Toxingene in *C. difficile* liegen im sogenannten „Pathogenitätsloкус“ (PaLoc) (Braun et al., 1996). Neben den Toxingenen befinden sich auch *tcdR*, *tcdC* und *tcdE* im PaLoc. Der

alternative Sigma-Faktor TcdR, der die Transkription der Toxingene steuert, zeigt keine Unterschiede in den Sequenzen der verschiedenen Isolate. TcdC gilt als Antagonist zu TcdR (Matamouros et al., 2007). Mutationen in TcdC sollen mit der Hypervirulenz einiger Stämme in Zusammenhang stehen (Spigaglia und Mastrantonio, 2002; Carter et al., 2011). Von den 19 Stämmen haben 5 ein vollständiges *tcdC*, darunter der Referenzstamm 630 Δ *erm* und die Stämme DSM 28668, DSM 29627, DSM 29632 und DSM 29745. Alle fünf Stämme zeigten unterschiedliche Toxinkonzentrationen nach 48 h. Die Deletionen in den anderen Isolaten liegen im gleichen Bereich, sind aber unterschiedlich lang. Ein direkter Zusammenhang zur Toxinkonzentration ist nicht erkennbar.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass das an der Sekretion der Toxine beteiligte TcdE, welches der Proteinfamilie der Holine zugeordnet wird, in *C. difficile* in drei verschiedenen Isoformen vorliegen kann. Die lange Isoform weist einen geringen Effekt auf das Zellwachstum auf, während die kürzeste Isoform die Lyse der Zellen induziert (Mehner-Breitfeld et al., 2018). Die Referenzstämme 630 Δ *erm* und R20291 sowie die Stämme DSM 28668, DSM 29627, DSM29632 und DSM 29745 zeigen die lange Isoform, alle anderen Stämme zeigen die kürzeste Isoform. Wie schon für andere Stämme gezeigt (Govind et al., 2015), konnten für die Stämme mit der langen Isoform im ELISA höhere Toxinkonzentrationen als für die Stämme mit der kurzen Isoform nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellt der Stamm DSM 102860 dar, der zwar die kurze Isoform aufweist, im Experiment aber die mit Abstand höchste Toxinkonzentration zeigte.

Zusammengefasst konnten die Unterschiede in der extrazellulären Toxinkonzentration auf genomischer Ebene mit verschiedenen Isoformen von TcdE und dadurch bedingte Unterschiede in der Sekretion in Zusammenhang gebracht werden. Dennoch zeigten sich auch innerhalb der Gruppen mit der gleichen TcdE-Isoform Unterschiede in der Toxinkonzentration, die nicht auf genomischer Ebene erklärt werden können.

3.5.2. Fermentationsprofile der verschiedenen *C. difficile* Stämme

Zum Vergleich der Gärprodukte aus den Stickland-Reaktionen und dem Zentralstoffwechsel der 19 Stämme wurde eine Heatmap mit den relativen Werten der Metabolite erstellt, bezogen auf den Mittelwert über alle Isolate (Abb. 35). Viele Metabolite konnten in sehr ähnlichen Mengen in allen Isolaten detektiert werden. Darunter befanden sich vor allem kurzkettige Säuren, verzweigtkettige Säuren und Alkohole aus dem Zentralstoffwechsel sowie die Stickland-Produkte der verzweigtkettigen Aminosäuren und 5-Aminovalerat.

Längerkettige Säuren und Alkohole (Pentanoat, Hexanoat, 1-Butanol, 1-Pentanol und 1-Hexanol) wiesen sehr starke Unterschiede, bis zu dem 3,5-fachen des Mittelwerts über alle Isolate, auf.

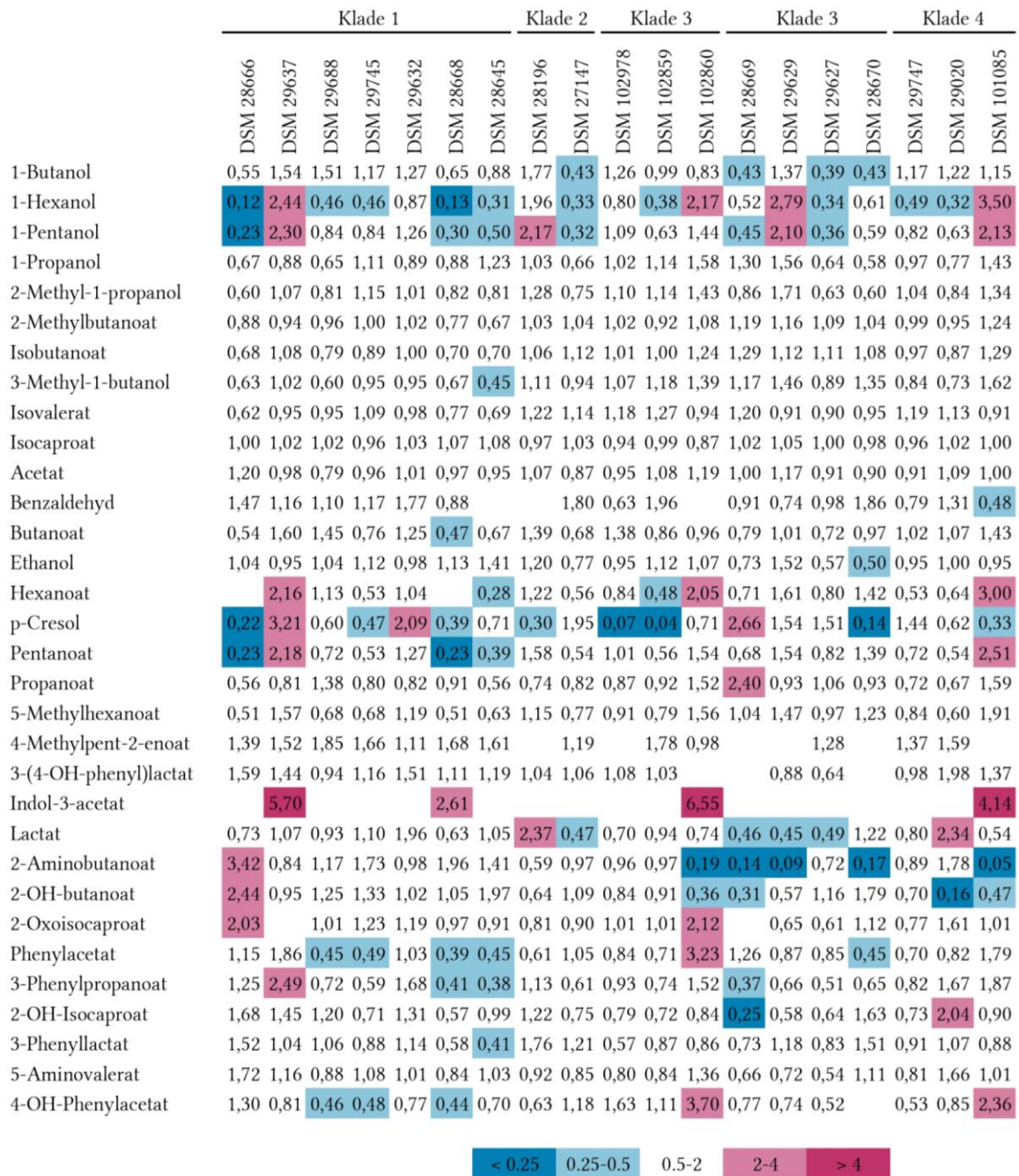


Abb. 35: Heatmap der Gärprodukte der 19 *C. difficile* Isolate in der stationären Phase. Die Proben stammen aus 3 unabhängigen Kultivierungen in CDMM, ausgewertet von Meina Neumann-Schaal. Zum Vergleich der Isolate wurden die ermittelten Peakflächen auf den Mittelwert der Isolate, in denen der Metabolit nachgewiesen werden konnte, bezogen.

Ein Vergleich der Verhältnisse zwischen Isocaproat und Isovalerat, 3-Phenylpropanoat und Phenylacetat bzw. Isocaproat und 3-Phenylpropanoat zeigte keine Verhältnismäßigkeit zur Toxinproduktion oder der extrazellulären Toxinkonzentration. Jedoch konnte bei dem Stamm mit der höchsten extrazellulären Toxinkonzentration die mit Abstand höchste relative Konzentration an Phenylacetat und 4-Hydroxyphenylacetat, mit der 3,2- und 3,7-fachen Menge, nachgewiesen werden. Dementsprechend war dies auch der Stamm mit der höchsten Tyrosinaufnahme und einer vollständigen Phenylalaninaufnahme (Tab. 14). Von den anderen Stämmen mit Toxinproduktion zeigten nur DSM 29632 und DSM 28196 eine vollständige Phenylalaninaufnahme, dieses wurde jedoch eher in der reduktiven Stickland-Reaktion umgesetzt, was an den leicht erhöhten Werten von 3-Phenylpropanoat und 3-Phenyllactat erkennbar ist (Abb. 35). Die stark erhöhte Toxinproduktion des Stammes DSM 102860 könnte daher aus dem erhöhten Umsatz der aromatischen Aminosäuren in der oxidativen Stickland-Reaktion resultieren. Eine weitere Möglichkeit wäre ein Zusammenhang mit der Expression der entsprechenden Gene *iorAB*, die für die Indolpyruvat-Oxidoreduktase codieren, die aufgrund der hohen Umsetzung stärker exprimiert werden müssten, oder dem Protein selbst.

Tab. 14: Restgehalt der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin im Kulturüberstand nach 24 h. Die Aminosäurekonzentrationen wurden mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektor als OPA-Derivate bestimmt und auf die im Medium ursprünglich vorhandene Konzentration der Aminosäure bezogen.

DSM-Nr.	Tyrosin [%]	Phenylalanin [%]	DSM-Nr.	Tyrosin [%]	Phenylalanin [%]
DSM 28666	87,3 ± 5,6	12,6 ± 1,7	DSM 102859	44,2 ± 2,2	8,8 ± 0,3
DSM 29637	14,4 ± 0,7	n.d.	DSM 102860	7,8 ± 1,2	n.d.
DSM 29688	52,6 ± 3,0	11,8 ± 0,4	DSM 28669	20,2 ± 2,9	6,8 ± 1,1
DSM 29745	64,1 ± 2,2	12,6 ± 0,3	DSM 29629	18,7 ± 1,3	n.d.
DSM 29632	30,4 ± 0,3	n.d.	DSM 29627	33,6 ± 1,3	11,3 ± 0,6
DSM 28668	99,6 ± 2,7	15,8 ± 1,6	DSM 28670	34,8 ± 1,4	9,7 ± 0,6
DSM 28645	59,2 ± 1,3	11,7 ± 1,9	DSM 29747	38,4 ± 0,5	8,5 ± 1,1
DSM 28196	28,8 ± 2,2	n.d.	DSM 29020	45,6 ± 2,3	10,5 ± 0,8
DSM 27147	30,2 ± 0,1	2,2 ± 0,6	DSM 101085	10,5 ± 0,7	n.d.
DSM 102978	36,8 ± 2,0	9,3 ± 1,7			

Eine weitere Auffälligkeit im Fermentationsprofil zeigte sich in der Lactatproduktion. Hier wiesen die beiden Stämme mit der geringsten extrazellulären Toxinkonzentration, DSM 28196 und DSM 29020, erhöhte relative Konzentrationen um das bis zu 2,4-fache

auf. Ein Zusammenhang zwischen Lactat-Stoffwechsel und Toxinproduktion wurde bereits im Kapitel 3.2.2 diskutiert. Es wurde ein Zusammenhang zum Redoxpotential der Zelle festgestellt und dieser in Zusammenhang mit der Toxinsekretion durch TcdE gebracht. Beide Stämme weisen die kürzeste Isoform von TcdE auf, wodurch die Toxinsekretion auf der Zelllyse basieren soll (Mehner-Breitfeld et al., 2018). Der Stamm DSM 28196 zeigte keinen Abfall der optischen Dichte, während der Stamm DSM 29020 einen leichten Abfall der optischen Dichte zeigte (Abb. 33). Die Zelllyse und die damit verbundene Toxinsekretion könnten hier aufgrund der erhöhten Lactatproduktion reduziert sein.

Zusammengefasst variieren sowohl das Wachstum und die Toxingehalte als auch die Fermentationsprofile zwischen den verschiedenen *C. difficile*-Isolaten. Ein Zusammenhang zwischen den Kladen konnte nicht festgestellt werden. Ein Zusammenhang zwischen Metabolom und Toxinproduktion konnte für drei der Isolate festgestellt werden. Der Stamm DSM 102860, der die höchste extrazelluläre Toxinkonzentration aufwies, zeigte einen stark erhöhten Abbau der aromatischen Aminosäuren über die oxidative Stickland-Reaktion zu 3-Phenylpropanoat, 4-Hydroxyphenylacetat und Indole-3-acetat. Die Stämme DSM 28196 und DSM 29020, die die geringste extrazelluläre Toxinkonzentration aufwiesen, zeigten erhöhte extrazelluläre Lactatkonzentrationen. Die Unterschiede in der extrazellulären Toxinkonzentration der anderen Isolate könnte ebenso durch die individuelle metabolische Anpassung der einzelnen Stämme hervorgerufen werden.

Der verwendete Modellstamm DSM 28645 (*C. difficile* 630 Δ erm) zeigt im Vergleich einen mittleren Toxingehalt und ein schnelles Wachstum. Das Fermentationsprofil weist nur geringe Unterschiede zu den anderen Stämmen auf. Auch in der Nutzung der aromatischen Aminosäuren ist er vergleichbar mit den anderen Stämmen und stellt damit einen geeigneten Referenzstamm dar. Trotzdem können die mit einem Stamm gesammelten Erkenntnisse, aufgrund der starken Variation zwischen den einzelnen Stämmen, nicht mit Sicherheit auf alle *C. difficile*-Isolate bezogen werden. Gemeinsam mit den individuellen Gegebenheiten des menschlichen Verdauungstrakts als Lebensraum erklärt dies auch die starken Unterschiede in den Verläufen von Infektionen mit *C. difficile*, die durch die Unterschiede im Stoffwechsel der einzelnen Isolate, aber auch durch die Unterschiede im menschlichen Stoffwechsel und im Mikrobiom des Wirts hervorgerufen werden können.

4. Zusammenfassung

Die Produktion der Toxine A und B ist einer der Hauptvirulenzfaktoren des nosokomialen Pathogenen *C. difficile* 630 Δ erm. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Umgebungsbedingungen, hier erzeugt durch Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums, die Toxinproduktion oder die Toxinsekretion beeinflussen können. Die zugrunde liegenden Vorgänge in den Zellen konnten auf Anpassungen im Metabolom oder dessen Regulation zurückgeführt werden. Diese variierten sehr stark, in Abhängigkeit von den durchgeführten Veränderungen (Abb. 36).

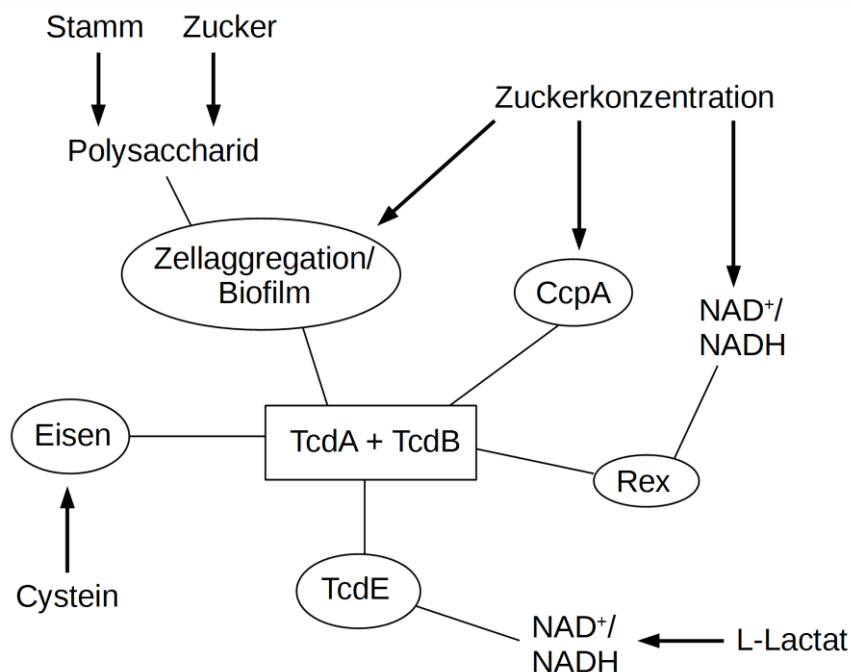


Abb. 36: Übersicht der in dieser Arbeit festgestellten Zusammenhänge zwischen Metabolom und Toxinproduktion und vermutete zugrundeliegende Regulationen.

Die Sekretion der Toxine wird erst in der stationären Phase eingeleitet, intrazellulär können die Toxine jedoch schon in der exponentiellen Phase nachgewiesen werden. Die Regulation der Toxinproduktion kann daher schon im Wachstum erfolgen. Während der Toxinsekretion in der stationären Phase sinkt die intrazelluläre Toxinkonzentration.

Im Caseinhydrolysat-Medium zeigten vor allem Zucker und über den Zentralstoffwechsel abgebaute Aminosäuren die größten Effekte auf die Toxinproduktion. Bei den Zuckern hatte zum einen die Art des Zuckers und zum anderen die Konzentration Einfluss auf die Toxinproduktion. In Kultivierungen mit Mannose wurde die in Kulturen mit Glucose beobachtete Zellaggregation nicht nachgewiesen, was zu einer erhöhten Toxinproduktion der planktonischen Zellen führte.

Die Unterschiede in der Zellaggregation in den Kulturen mit Glucose bzw. Mannose kann daher vermutlich auf Veränderungen in der Polysaccharidbildung zurückgeführt werden, welches in Kultivierungen mit 2 g/L Glucose aus acetylierten Glucoseeinheiten besteht (Dannheim et al., 2017b). Die planktonischen Zellen in der stationären Phase in der Kultivierung mit Mannose führten zu einem höheren Abbau von Aminosäuren und erhöhten Konzentrationen der Produkte des Zentralstoffwechsels.

In Kultivierungen mit hohen Glucosekonzentrationen findet eine Kohlenstoff-Katabolitrepression statt, die zu einer starken Reduzierung der Toxinproduktion führte. Durch das *Catabolite-Control*-Protein CcpA werden neben den Toxingenen auch viele Gene, die für Enzyme der Stickland-Reaktionen und des Zentralstoffwechsels codieren, herunter reguliert. Auch in diesen Kultivierungen konnte keine Zellaggregation nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die dafür zuständigen Gene ebenfalls herunter reguliert werden. Durch die gleichzeitige Reduktion der Toxingenexpression kommt es jedoch nicht zu der Erhöhung der Toxinproduktion in den planktonischen Zellen, wie sie in der Kultivierung mit Mannose beobachtet wurde.

Eine moderate Glucosekonzentration von 2 g/L im Medium führte zu einer erhöhten Toxinproduktion im Vergleich zu Kultivierungen ohne Glucose. Hier wurden Unterschiede in der Toxinsekretion festgestellt. In Zellen, die mit Glucose im Medium kultiviert wurden, wurde ein starkes Absinken des intrazellulären Toxins in der frühen stationären Phase beobachtet. Dies wird auf Unterschiede in der Sekretion durch das Holin-ähnliche Protein TcdE zurückzuführen sein. Ein weiterer Zusammenhang konnte zum Energieniveau in der Zelle bzw. zum Redoxpotential aufgrund von Unterschieden im NAD^+/NADH -Verhältnis festgestellt werden, welche vermutlich eine Regulation durch den Redox-Sensor-Regulator (Rex) hervorrufen.

Ein Zusammenhang zwischen dem NAD^+/NADH -Verhältnis und einer reduzierten extrazellulären Toxinkonzentration wurde auch für Kultivierung mit 0,5 g/L L-Lactat im Medium festgestellt. Im Vergleich zu Kultivierungen ohne Lactat, ließen sich hier im Metabolom und Transkriptom nur Unterschiede im Lactatstoffwechsel nachweisen. Eine Regulation durch Rex erschien unwahrscheinlich, da dieser dafür bekannt ist, in Clostridien Regulationen in Fermentationsprozessen wie der Buttersäuregärung hervorzurufen (Ravcheev et al., 2012; Zhang et al., 2014). Daher wird vermutet, dass das NAD^+/NADH -Verhältnis über die Disulfidbrückenbildung einen Einfluss auf die Oligomerisierung des TcdE aufweisen könnte und dadurch die Sekretion der Toxine beeinflusst wird. Da das Lactat vermutlich aufgrund der hohen extrazellulären

Konzentration durch einen Symporter/Antiporter bis zu einer Gleichgewichtseinstellung in die Zelle aufgenommen wird, kann ein Einfluss des intrazellulären Lactats nicht aufgeschlossen werden.

In Kultivierungen mit verschiedenen Cysteinkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass die durch eine Cysteinsupplementierung hervorgerufene bekannte Reduktion der Toxinproduktion auf einen starken Eisenmangel zurückzuführen ist. Durch den, bei der Umsetzung des Cysteins entstehenden, Schwefelwasserstoff bildet sich unlösliches Eisensulfid im Kulturüberstand. Dadurch können viele Stickland-Reaktionen und Fermentationen des Zentralstoffwechsels nicht ablaufen, in denen Ferredoxin als Elektronenüberträger genutzt wird. Der Stofffluss im Zentralstoffwechsel verschiebt sich dadurch zur Reaktion vom Pyruvat zum Lactat, wobei in diesem Fall, katalysiert durch die L-Lactatdehydrogenase (Ldh), L-Lactat gebildet wird, da bei der über Elektronen-Bifurkation laufenden Lactatbildung ebenfalls Ferredoxin als Elektronenüberträger fungiert.

Die in den Experimenten mit dem Modellorganismus *C. difficile* 630 Δ *erm* gewonnenen Erkenntnisse konnten in einem Experiment mit 18 weiteren Patientenisolaten zum Teil auch auf weitere Stämme angewendet werden. Der Stamm DSM 102860 mit der höchsten Toxinproduktion zeigte keine Zellaggregation. Die Stämme mit der geringsten Toxinproduktion zeigten die höchste extrazelluläre Lactatkonzentration. Insgesamt variierten die verschiedenen Stämme in den Fermentationsprofilen und der extrazellulären Toxinkonzentration jedoch so stark, dass davon ausgegangen werden kann, dass die Erkenntnisse, die mit einem Stamm gewonnen wurden, nicht zwangsläufig auf alle Isolate angewendet werden können.

Im Bezug auf eine Infektion mit *C. difficile* zeigen die gesammelten Erkenntnisse verschiedene Angriffspunkte auf. Eine kohlenhydratarme Ernährung mit einer zusätzlichen Gabe von Lactat oder Probiotika könnte die Toxinproduktion senken, und so zu einer Verringerung der Symptome während der Infektion führen. Eine Störung der Biofilmbildung könnte Auswirkungen auf die Antibiotika-Resistenz des Bakteriums und die oft wiederkehrenden Infektionen haben, wodurch sich ein guter Ansatz für die Entwicklung von Therapeutika ergibt. Ein weiterer Ansatz für Therapeutika könnte die Störung des Eisenstoffwechsels von *C. difficile* sein. Da Eisen jedoch ein essentielles Metall für fast alle Bakterien und auch für den Menschen ist, wird sich dies, ohne eine zusätzliche Belastung des menschlichen Organismus hervorzurufen, vermutlich nicht realisieren lassen.

5. Literaturverzeichnis

- Aboulnaga, E.-H., Pinkenburg, O., Schiffels, J., El-Refai, A., Buckel, W., und Selmer, T. (2013). Effect of an oxygen-tolerant bifurcating butyryl coenzyme A dehydrogenase/electron-transferring flavoprotein complex from *Clostridium difficile* on butyrate production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 195, 3704–3713.
- Ahn, S.-J., Rice, K. C., Oleas, J., Bayles, K. W., und Burne, R. A. (2010). The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals. *Microbiology (Reading, England)* 156, 3136–3147.
- Ali, S., Moore, G., und Wilson, A. P. R. (2011). Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 79, 97–98.
- Allwood, J. W., und Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Analysis : PCA* 21, 33–47.
- Andersch, W., Bahl, H., und Gottschalk, G. (1983). Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 327–332.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., und Rodríguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215–237.
- Antunes, A., Camiade, E., Monot, M., Courtois, E., Barbut, F., Sernova, N. V., et al. (2012). Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. *Nucleic Acids Res.* 40, 10701–10718.
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E., und Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes* 5, 579–593.
- Badet, C., Furiga, A., und Thébaud, N. (2008). Effect of xylitol on an in vitro model of oral biofilm. *Oral Health Prev. Dent.* 6, 337–341.
- Bakker, D., Smits, W. K., Kuijper, E. J., und Corver, J. (2012). TcdC does not significantly repress toxin expression in *Clostridium difficile* 630ΔErm. *PloS one* 7, e43247.
- Baltes, W., und Matissek, R. (2011). Lebensmittelchemie. Heidelberg: Springer.
- Barc, M. C., Depitre, C., Corthier, G., Collignon, A., Su, W. J., und Bourlioux, P. (1992). Effects of antibiotics and other drugs on toxin production in *Clostridium difficile* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1332–1335.
- Bard, R. C., und Gunsalus, I. C. (1950). Glucose metabolism of *Clostridium perfringens*: existence of metallo-aldolase. *J. Bacteriol.* 59, 387–400.
- Barker, H. A. (1981). Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 23–40.
- Bartlett, J. G., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L., und Onderdonk, A. B. (1978). Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* 298, 531–534.

- Beier, D., und Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 143–152.
- Benjamini, Y., und Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B* 57, 289–300.
- Berges, M., Michel, A.-M., Lassek, C., Nuss, A. M., Beckstette, M., Dersch, P., et al. (2018). Iron regulation in *Clostridioides difficile*. *Front. Microbiol.*
- Bertsch, J., Parthasarathy, A., Buckel, W., und Muller, V. (2013). An electron-bifurcating caffeyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 288, 11304–11311.
- Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. Jo. Clin. Nutr.* 73, 399S–405S.
- Biegel, E., und Muller, V. (2010). Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺-oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18138–18142.
- Bolten, C. J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J.-C., und Wittmann, C. (2007). Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal. Chem.* 79, 3843–3849.
- Bouillaut, L., Dubois, T., Sonenshein, A. L., und Dupuy, B. (2015). Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. *Res. Microbiol.* 166, 375–383.
- Bouillaut, L., Self, W. T., und Sonenshein, A. L. (2013). Proline-dependent regulation of *Clostridium difficile* Stickland metabolism. *J. Bacteriol.* 195, 844–854.
- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A. J., et al. (2016). UniProtKB/Swiss-Prot, the manually annotated section of the UniProt KnowledgeBase: How to use the entry view. *Methods Mol. Biol.* 1374, 23–54.
- Boynton, Z. L., Bennet, G. N., und Rudolph, F. B. (1996). Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* 178, 3015–3024.
- Braun, V., Hundsberger, T., Leukel, P., Sauerborn, M., Eichel-Streiber, C. von, und Sauerborn, M. (1996). Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181, 29–38.
- Brekasis, D., und Paget, M. S. B. (2003). A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 22, 4856–4865.
- Brink, B., Konings, W. N., und Konings, W. N. (1980). Generation of an electrochemical proton gradient by lactate efflux in membrane vesicles of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 111, 59–66.
- Britz, M. L., und Wilkinson, R. G. (1982). Leucine dissimilation to isovaleric and isocaproic acids by cell suspensions of amino acid fermenting anaerobes: The Stickland reaction revisited. *Can. J. Microbiol.* 28, 291–300.
- Brouwer, M. S. M., Roberts, A. P., Hussain, H., Williams, R. J., Allan, E., und Mullany, P. (2013). Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun* 4, 2601.
- Buckel, W., und Thauer, R. K. (2018a). Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chem. Rev.* 118, 3862–3886.

- Buckel, W., und Thauer, R. K. (2018b). Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as electron acceptors: a historical review. *Front. Microbiol.* 9, 401.
- Carter, G. P., Douce, G. R., Govind, R., Howarth, P. M., Mackin, K. E., Spencer, J., et al. (2011). The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile*. *PLoS Pathog.* 7, e1002317.
- Cartman, S. T., Kelly, M. L., Heeg, D., Heap, J. T., und Minton, N. P. (2012). Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the tcdC genotype and toxin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4683–4690.
- Cartman, S. T., und Minton, N. P. (2010). A mariner-based transposon system for in vivo random mutagenesis of *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1103–1109.
- Cary, J. W., Petersen, D. J., Papoutsakis, E. T., und Bennett, G. N. (1988). Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 4613–4618.
- Caspi, R., Billington, R., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., et al. (2018). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.* 46, D633–D639.
- Cassat, J. E., und Skaar, E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* 13, 509–519.
- Cernat, R. C., und Scott, K. P. (2012). Evaluation of novel assays to assess the influence of different iron sources on the growth of *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 18, 298–304.
- Chandrasekaran, R., und Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 723–750.
- Chang, C., und Stewart, R. C. (1998). The two-component system. *Plant Physiol.* 117, 723–731.
- Clausen, M. R., und Mortensen, P. B. (1997). Lactulose, disaccharides and colonic flora. Clinical consequences. *Drugs* 53, 930–942.
- Collins, J., Robinson, C., Danhof, H., Knetsch, C. W., van Leeuwen, H. C., Lawley, T. D., et al. (2018). Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile*. *Nature* 553, 291–294.
- Contag, P. R., Williams, M. G., und Rogers, P. (1990). Cloning of a lactate dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* B643 and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3760–3765.
- Cox, J., und Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372.
- Cox, J., und Mann, M. (2011). Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 273–299.
- Cremer, E., und Roselius, L. (1958). Gaschromatographie. *Angew. Chem.* 70, 42–50.
- Dannheim, H., Riedel, T., Neumann-Schaal, M., Bunk, B., Schober, I., Sproer, C., et al. (2017a). Manual curation and reannotation of the genomes of *Clostridium difficile* 630Δerm and *Clostridium difficile* 630. *J. Med. Microbiol.*

- Dannheim, H., Will, S. E., Schomburg, D., und Neumann-Schaal, M. (2017b). *Clostridioides difficile* 630 Δ erm in silico and in vivo: Quantitative growth and extensive polysaccharide secretion. *FEBS Open Bio*.
- Dapa, T., und Unnikrishnan, M. (2013). Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut microbes* 4, 397–402.
- Dapa, T., Dapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., et al. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 195, 545–555.
- Darkoh, C., DuPont, H. L., Norris, S. J., und Kaplan, H. B. (2015). Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. *mBio* 6, e02569.
- Dehghan, P., Pourghassem Gargari, B., und Asgharijafarabadi, M. (2013). Effects of high performance inulin supplementation on glycemic status and lipid profile in women with type 2 diabetes: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Health Promot. Perspect.* 3, 55–63.
- Dettmer, K., Aronov, P. A., und Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spec. Rev.* 26, 51–78.
- Deutscher, J., Francke, C., und Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.: MMBR* 70, 939–1031.
- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., und Di Masi, A. (2016). *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins* 8.
- Dickert, S., Pierik, A. J., Linder, D., und Buckel, W. (2000). The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (R)-phenyllactate to (E)-cinnamate by *Clostridium sporogenes*. *Eur. J. Biochem.* 267, 3874–3884.
- Dineen, S. S., McBride, S. M., und Sonenshein, A. L. (2010). Integration of metabolism and virulence by *Clostridium difficile* CodY 192, 5350–5362.
- Dineen, S. S., Villapakkam, A. C., Nordman, J. T., und Sonenshein, A. L. (2007). Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol. Microbiol.* 66, 206–219.
- Dingle, K. E., Elliott, B., Robinson, E., Griffiths, D., Eyre, D. W., Stoesser, N., et al. (2014). Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. *Genome Biol. Evol.* 6, 36–52.
- Disler, P. B., Lynch, S. R., Charlton, R. W., Torrance, J. D., Bothwell, T. H., Walker, R. B., et al. (1975). The effect of tea on iron absorption. *Gut* 16, 193–200.
- Driessen, A. J. M., und Konings, W. N. (1990). “Energetic problems of bacterial fermentations: Extrusion of metabolic end products,” in *The Bacteria*, 449–478.
- Dubois, T., Dancer-Thibonnier, M., Monot, M., Hamiot, A., Bouillaut, L., Soutourina, O., et al. (2016). Control of *Clostridium difficile* physiopathology in response to cysteine availability. *Infect. Immun.* 84, 2389–2405.
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., und Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J. Med. Microbiol.* 57, 685–689.
- Dupuy, B., und Sonenshein, A. L. (1998). Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. *Mol. Microbiol.* 27, 107–120.

- Elias, H.-G. (2009). Chemische Struktur und Synthesen. Weinheim [u.a.]: Wiley-VCH.
- Elsden, S. R., und Hilton, M. G. (1978). Volatile acid production from threonine, valine, leucine and isoleucine by clostridia. *Arch. Microbiol.* 117, 165–172.
- Elsden, S. R., und Hilton, M. G. (1979). Amino acid utilization patterns in clostridial taxonomy. *Arch. Microbiol.* 123, 137–141.
- Elsden, S. R., Hilton, M. G., und Waller, J. M. (1976). The end products of the metabolism of aromatic amino acids by Clostridia. *Arch. Microbiol.* 107, 283–288.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J., und Lorenzo, V. de (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181, 6223–6229.
- Evans, A. M., DeHaven, C. D., Barrett, T., Mitchell, M., und Milgram, E. (2009). Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal. Chem.* 81, 6656–6667.
- Evans, M. C., Buchanan, B. B., und Arnon, D. I. (1966). A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 55, 928–934.
- Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., und Whitehouse, C. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Funct. Genomics*, 155–171.
- Fonknechten, N., Chaussonnerie, S., Tricot, S., Lajus, A., Andreesen, J. R., Perchat, N., et al. (2010). *Clostridium sticklandii*, a specialist in amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. *BMC Genomics* 11, 555.
- Fontaine, L., Meynial-Salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C., und Soucaille, P. (2002). Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* 184, 821–830.
- Gallagher, I. H., und Pearce, E. I. (1977). The sugar alcohols. Non-cariogenic sweeteners. *N. Z. Dent. J.* 73, 200–206.
- Ganong, W. F., und Auerswald, W. (1972). Medizinische Physiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M., und Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut microbes* 5, 15–27.
- Giel, J. L., Sorg, J. A., Sonenshein, A. L., und Zhu, J. (2010). Metabolism of bile salts in mice influences spore germination in *Clostridium difficile*. *PloS one* 5, e8740.
- Gillis, C. C., Hughes, E. R., Spiga, L., Winter, M. G., Zhu, W., Furtado de Carvalho, T., et al. (2018). Dysbiosis-associated change in host metabolism generates lactate to support *Salmonella* growth. *Cell Host Microbe* 23, 54–64.e6.
- Govind, R., und Dupuy, B. (2012). Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. *PLoS Pathog.* 8, e1002727.

- Govind, R., Fitzwater, L., und Nichols, R. (2015). Observations on the Role of TcdE Isoforms in *Clostridium difficile* Toxin Secretion. *J. Bacteriol.* 197, 2600–2609.
- Govind, R., VEDIYAPPAN, G., Rolfe, R. D., und Fralick, J. A. (2006). Evidence that *Clostridium difficile* TcdC is a membrane-associated protein. *J. Bacteriol.* 188, 3716–3720.
- Graentzdoerffer, A., Pich, A., und Andreessen, J. R. (2001). Molecular analysis of the *grd* operon coding for genes of the glycine reductase and of the thioredoxin system from *Clostridium sticklandii*. *Arch. Microbiol.* 175, 8–18.
- Gunsalus, I. C., Horecker, B. L., und Wood, W. A. (1955). Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 19, 79–128.
- Halket, J. M., und Zaikin, V. G. (2003). Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation. *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 1–21.
- Hall, I. C., und O'Toole, E. (1935). Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 49, 390.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., und Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Hall-Stoodley, L., und Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1034–1043.
- Hammond, G. A., und Johnson, J. L. (1995). The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. *Microb. Pathog.* 19, 203–213.
- Heider, J., Mai, X., und Adams, M. W. (1996). Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. *J. Bacteriol.* 178, 780–787.
- Herderich, M., und Schreier, P. (1993). High resolution gas chromatography–mass spectral analysis of carbohydrates using methoxyoxime acetates. *Phytochem. Anal.* 4, 256–260.
- Hetzel, M., Brock, M., Selmer, T., Pierik, A. J., Golding, B. T., und Buckel, W. (2003). Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *Eur. J. Biochem.* 270, 902–910.
- Hiller, K., Hangebrauk, J., Jäger, C., Spura, J., Schreiber, K., und Schomburg, D. (2009). MetaboliteDetector: comprehensive analysis tool for targeted and nontargeted GC/MS based metabolome analysis. *Anal. Chem.* 81, 3429–3439.
- Ho, T. D., und Ellermeier, C. D. (2015). Ferric uptake regulator Fur control of putative iron acquisition systems in *Clostridium difficile* 197, 2930–2940.
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 165–170.
- Hofmann, J. D., Otto, A., Berges, M., Biedendieck, R., Michel, A.-M., Becher, D., et al. (2018). Metabolic reprogramming of *Clostridioides difficile* during the stationary phase with the induction of toxin production. *Front. Microbiol.* 9, 1970.
- Hofmeister, A. E., Grabowski, R., Linder, D., und Buckel, W. (1993). L-serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups. *Eur. J. Biochem.* 215, 341–349.

- Honda, T., Hernadez, I., Katoh, T., und Miwatani, T. (1983). Stimulation of enterotoxin production of *Clostridium difficile* by antibiotics. *The Lancet* 321, 655.
- Huang, W., und Wilks, A. (2017). Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 799–823.
- Hugo, H. von, Schoberth, S., Madan, V. K., und Gottschalk, G. (1972). Coenzyme specificity of dehydrogenases and fermentation of pyruvate by clostridia. *Arch. Microbiol.* 87, 189–202.
- Hummel, J., Selbig, J., Walther, D., und Kopka, J. (2007). The Golm metabolome database: a database for GC-MS based metabolite profiling 18, 75–95.
- Hundsberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M., und Eichel-Streiber, C. (1997). Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. *Eur. J. Biochem.* 244, 735–742.
- Hussain, H. A., Roberts, A. P., und Mullany, P. (2005). Generation of an erythromycin-sensitive derivative of *Clostridium difficile* strain 630 (630 Δ erm) and demonstration that the conjugative transposon Tn916 E enters the genome of this strain at multiple sites. *J. Med. Microbiol.* 54, 137–141.
- Ismail, A. A., Zhu, C. X., Colby, G. D., und Chen, J. S. (1993). Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J. Bacteriol.* 175, 5097–5105.
- Jackson, S., Calos, M., Myers, A., und Self, W. T. (2006). Analysis of proline reduction in the nosocomial pathogen *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 188, 8487–8495.
- Janežic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., und Rupnik, M. (2016). Highly divergent *Clostridium difficile* strains isolated from the environment. *PloS one* 11, e0167101.
- Jank, T., und Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: The ABCD model. *Trends Microbiol.* 16, 222–229.
- Janssen, I., Cooper, P., Gunka, K., Rupnik, M., Wetzel, D., Zimmermann, O., et al. (2016). High prevalence of nontoxigenic *Clostridium difficile* isolated from hospitalized and non-hospitalized individuals in rural Ghana. *Int. J. Med. Microbiol.: IJMM* 306, 652–656.
- Jump, R. L. P., Pultz, M. J., und Donskey, C. J. (2007). Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2883–2887.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Eichel-Streiber, C. von, Mann, M., und Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375, 500–503.
- Kabisch, U. C., Grantzdorffer, A., Schierhorn, A., Rucknagel, K. P., Andreesen, J. R., und Pich, A. (1999). Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoenzyme and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. *J. Biol. Chem.* 274, 8445–8454.
- Kakuta, H., Iwami, Y., Mayanagi, H., und Takahashi, N. (2003). Xylitol inhibition of acid production and growth of mutants Streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. *Caries Res.* 37, 404–409.
- Kanani, H. H., und Klapa, M. I. (2007). Data correction strategy for metabolomics analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Metab. Eng.* 9, 39–51.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., und Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D457–62.

- Kaplan, H., Hill, K., Lancaster, J., und Hurtado, A. M. (2000). A theory of human life history evolution: Diet, intelligence, and longevity. *Evol. Anthropol.* 9, 156–185.
- Karlsson, S., Burman, L. G., und Akerlund, T. (1999). Suppression of toxin production in *Clostridium difficile* VPI 10463 by amino acids. *Microbiol.* 145, 1683–1693.
- Karlsson, S., Burman, L. G., und Akerlund, T. (2008). Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiol.* 154, 3430–3436.
- Karlsson, S., Dupuy, B., Mukherjee, K., Norin, E., Burman, L. G., und Akerlund, T. (2003). Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature. *Infect. Immun.* 71, 1784–1793.
- Karlsson, S., Lindberg, A., Norin, E., Burman, L. G., und Akerlund, T. (2000). Toxins, butyric acid, and other short-chain fatty acids are coordinately expressed and down-regulated by cysteine in *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 68, 5881–5888.
- Kelly, C. P., und Lamont, J. T. (1998). *Clostridium difficile* infection. *Annu. Rev. Med.* 49, 375–390.
- Kelly, C. P., Pothoulakis, C., und Lamont, J. T. (1994). *Clostridium difficile* colitis. *N. Engl. J. Med.* 330, 257–262.
- Khanna, S., Pardi, D. S., Aronson, S. L., Kammer, P. P., Orenstein, R., St Sauver, J. L., et al. (2012). The epidemiology of community-acquired *clostridium difficile* Infection: A population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 150.
- Kim, J., Darley, D., und Buckel, W. (2005). 2-Hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase and its activator from *Clostridium difficile*. *FEBS J.* 272, 550–561.
- Kim, J., Darley, D., Selmer, T., und Buckel, W. (2006). Characterization of (R)-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase and a family III coenzyme A transferase involved in reduction of L-leucine to isocaproate by *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6062–6069.
- Kim, J., Darley, D. J., Buckel, W., und Pierik, A. J. (2008). An allylic ketyl radical intermediate in clostridial amino-acid fermentation. *Nature* 452, 239–242.
- Kim, J., Hetzel, M., Boiangiu, C. D., und Buckel, W. (2004). Dehydration of (R)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of alpha-amino acids by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 455–468.
- Knight, D. R., Elliott, B., Chang, B. J., Perkins, T. T., und Riley, T. V. (2015). Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 721–741.
- Konings, W. N., Poolman, B., und Driessen, A. M. (1992). Can the excretion of metabolites by bacteria be manipulated? *FEMS Microbiol. Lett.* 88, 93–108.
- Köpke, M., Straub, M., und Dürre, P. (2013). *Clostridium difficile* is an autotrophic bacterial pathogen. *PLoS ONE* 8, e62157.
- Kortman, G. A. M., Raffatellu, M., Swinkels, D. W., und Tjalsma, H. (2014). Nutritional iron turned inside out: intestinal stress from a gut microbial perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1202–1234.
- Laouami, S., Messaoudi, K., Alberto, F., Clavel, T., und Duport, C. (2011). Lactate dehydrogenase A promotes communication between carbohydrate catabolism and virulence in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 193, 1757–1766.

- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., und Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prevot 1938. *Anaerobe* 40, 95–99.
- Leclercq, C., Berardi, D., Sorbillo, M. R., und Lambe, J. (1999). Intake of saccharin, aspartame, acesulfame K and cyclamate in Italian teenagers: present levels and projections. *Food Addit. Contam.* 16, 99–109.
- Lee, S.-H., Choi, B.-K., und Kim, Y.-J. (2012). The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. *Arch. Oral Biol.* 57, 697–703.
- Leonardi, R., und Jackowski, S. (2007). Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. *EcoSal Plus* 2.
- Lessa, F. C., Mu, Y., Bamberg, W. M., Beldavs, Z. G., Dumyati, G. K., Dunn, J. R., et al. (2015). Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N. Engl. J. Med.* 372, 825–834.
- LEWIS, D., und Elsdén, S. R. (1955). The fermentation of L-threonine, L-serine, L-cysteine and acrylic acid by a gram-negative coccus. *Biochem. J.* 60, 683–692.
- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., und Thauer, R. K. (2008). Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* 190, 843–850.
- Ljungdahl, L. G. (1986). The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 415–450.
- Lu, W., Bennett, B. D., und Rabinowitz, J. D. (2008). Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J. Chroma. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 871, 236–242.
- Lübbert, C., Zimmermann, L., Borchert, J., Hörner, B., Mutters, R., und Rodloff, A. C. (2016). Epidemiology and recurrence rates of *Clostridium difficile* infections in germany: A secondary data analysis. *Infect. Dis. Ther.* 5, 545–554.
- Lund, E. K., Wharf, S. G., Fairweather-Tait, S. J., und Johnson, I. T. (1999). Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 250–255.
- Ma, Q., Kim, E.-Y., Lindsay, E. A., und Han, O. (2011). Bioactive dietary polyphenols inhibit heme iron absorption in a dose-dependent manner in human intestinal Caco-2 cells. *J. Food Sci.* 76, H143–50.
- Mai, X., und Adams, M. W. (1994). Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. *J. Biol. Chem.* 269, 16726–16732.
- Mäkinen, K. K. (1976). Possible mechanisms for the cariostatic effect of xylitol. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 15, 368–380.
- Mani, N., und Dupuy, B. (2001). Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98, 5844–5849.
- Mani, N., Lyras, D., Barroso, L., Howarth, P., Wilkins, T., Rood, J. I., et al. (2002). Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. *J. Bacteriol.* 184, 5971–5978.

- Martins, B. M., Macedo-Ribeiro, S., Bresser, J., Buckel, W., und Messerschmidt, A. (2005). Structural basis for stereo-specific catalysis in NAD⁽⁺⁾-dependent (R)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase from *Acidaminococcus fermentans*. *FEBS J.* 272, 269–281.
- Martin-Verstraete, I., Peltier, J., und Dupuy, B. (2016). The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. *Toxins* 8.
- Matamouros, S., England, P., und Dupuy, B. (2007). *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol. Microbiol.* 64, 1274–1288.
- Matsuki, T., Pédrón, T., Regnault, B., Mulet, C., Hara, T., und Sansonetti, P. J. (2013). Epithelial cell proliferation arrest induced by lactate and acetate from *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*. *PloS one* 8, e63053.
- McBride, S. M., und Sonenshein, A. L. (2011). Identification of a genetic locus responsible for antimicrobial peptide resistance in *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 79, 167–176.
- Mehner-Breitfeld, D., Rathmann, C., Riedel, T., Just, I., Gerhard, R., Overmann, J., et al. (2018). Evidence for an adaptation of a phage-derived holin/endolysin system to toxin transport in *Clostridioides difficile*. *Front. Microbiol.* 9, 715.
- Miller, B. A., Chen, L. F., Sexton, D. J., und Anderson, D. J. (2011). Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* Infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 32, 387–390.
- Miller, D. D., und Berner, L. A. (1989). Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? *Biol. Trace Elem. Res.* 19, 11–24.
- Miyasawa-Hori, H., Aizawa, S., und Takahashi, N. (2006). Difference in the xylitol sensitivity of acid production among *Streptococcus mutans* strains and the biochemical mechanism. *Oral Microbiol. Immunol.* 21, 201–205.
- Mock, J., Zheng, Y., Mueller, A. P., Ly, S., Tran, L., Segovia, S., et al. (2015). Energy conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electronBifurcation. *J. Bacteriol.* 197, 2965–2980.
- Modesto, A., und Drake, D. R. (2006). Multiple exposures to chlorhexidine and xylitol: Adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Curr. Microbiol.* 52, 418–423.
- Monot, M., Eckert, C., Lemire, A., Hamiot, A., Dubois, T., Tessier, C., et al. (2015). *Clostridium difficile*: New insights into the evolution of the pathogenicity locus. *Sci. Rep.* 5.
- Morck, T. A., Lynch, S. R., und Cook, J. D. (1983). Inhibition of food iron absorption by coffee. *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 416–420.
- Morozova, E. A., Kulikova, V. V., Yashin, D. V., Anufrieva, N. V., Anisimova, N. Y., Revtovich, S. V., et al. (2013). Kinetic parameters and cytotoxic activity of recombinant methionine γ -lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*. *Acta Naturae* 5, 92–98.
- Müller, V., und Biegel, E. (2013). Electron transport in strict anaerobes. In *Encyclopedia of Biophysics*, 633–640.
- Musfeldt, M., und Schonheit, P. (2002). Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic archaea: Heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii*. *J. Bacteriol.* 184, 636–644.

- Naaber, P., Lehto, E., Salminen, S., und Mikelsaar, M. (1996). Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 14, 205–209.
- Nair, R. V., Bennett, G. N., und Papoutsakis, E. T. (1994). Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* 176, 871–885.
- Nakamura, S., Nakashio, S., Yamakawa, K., Tanabe, N., und Nishida, S. (1982). Carbohydrate fermentation by *Clostridium difficile*. *Microbiol. Immunol.* 26, 107–111.
- NCBI Resource Coordinators (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018). D8-D13.
- Neumann-Schaal, M., Hofmann, J. D., Will, S. E., und Schomburg, D. (2015). Time-resolved amino acid uptake of *Clostridium difficile* 630 Δ erm and concomitant fermentation product and toxin formation. *BMC Microbiol.* 15, 281.
- Nicholson, J. K., und Lindon, J. C. (2008). Systems biology: Metabonomics. *Nature* 455, 1054–1056.
- Nisman, B. (1954). The Stickland reaction. *Bacteriol Rev* 18, 16–42.
- Ohta, M., Hamako, J., Yamamoto, S., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., et al. (1991). Structures of asparagine-linked oligosaccharides from hen egg-yolk antibody (IgY). Occurrence of unusual glucosylated oligo-mannose type oligosaccharides in a mature glycoprotein. *Glycoconjugate J.* 8, 400–413.
- Olling, A., Seehase, S., Minton, N. P., Tatge, H., Schröter, S., Kohlscheen, S., et al. (2012). Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the tcdE gene. *Microbial Pathogenesis* 52, 92–100.
- Onderdonk, A. B., Lowe, B. R., und Bartlett, J. G. (1979). Effect of environmental stress on *Clostridium difficile* toxin levels during continuous cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 637–641.
- O'Neil, S. R., und DeMoss, R. D. (1968). Tryptophan transaminase from *Clostridium sporogenes*. *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 361–369.
- Oren, A., und Garrity, G. M. (2016). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 3761–3764.
- Otto, R., Sonnenberg, A. S., Veldkamp, H., und Konings, W. N. (1980). Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5502–5506.
- Ozkan, M., Yilmaz, E. I., Lynd, L. R., und Ozcengiz, G. (2004). Cloning and expression of the *Clostridium thermocellum* L-lactate dehydrogenase gene in *Escherichia coli* and enzyme characterization. *Can. J. Microbiol.* 50, 845–851.
- Pagels, M., Fuchs, S., Pané-Farré, J., Kohler, C., Menschner, L., Hecker, M., et al. (2010). Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 76, 1142–1161.
- Pei, J., Zhou, Q., Jing, Q., Li, L., Dai, C., Li, H., et al. (2011). The mechanism for regulating ethanol fermentation by redox levels in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Metab. Eng.* 13, 186–193.
- Peterson, T., Falk, K.-E., Leong, S. A., Klein, M. P., und Neilands, J. B. (1980). Structure and behavior of spermidine siderophores. *J. Am. Chem. Soc.*, 7715–7718.

- Pizarro, F., Amar, M., und Stekel, A. (1987). Determination of iron in stools as a method to monitor consumption of iron-fortified products in infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 484–487.
- Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, M., Tillack, J., et al. (2017). BRENDA in 2017: new perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic Acids Res.* 45, D380-D388. doi: 10.1093/nar/gkw952
- Poquet, I., Saujet, L., Canette, A., Monot, M., Mihajlovic, J., Ghigo, J.-M., et al. (2018). *Clostridium difficile* biofilm: Remodeling metabolism and cell surface to build a sparse and heterogeneously aggregated architecture. *Front. Microbiol.* 9, 2084.
- Pruitt, R. N., und Lacy, D. B. (2012). Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 28.
- Ragsdale, S. W. (1997). The eastern and western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the east and west were won. *BioFactors* 6, 3–11.
- Rana, N. F., Sauvageot, N., Laplace, J.-M., Bao, Y., Nes, I., Rincé, A., et al. (2013). Redox balance via lactate dehydrogenase is important for multiple stress resistance and virulence in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 81, 2662–2668.
- Ranjit, D. K., Endres, J. L., und Bayles, K. W. (2011). *Staphylococcus aureus* CidA and LrgA proteins exhibit holin-like properties. *J. Bacteriol.* 193, 2468–2476.
- Ravcheev, D. A., Li, X., Latif, H., Zengler, K., Leyn, S. A., Korostelev, Y. D., et al. (2012). Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J. Bacteriol.* 194, 1145–1157.
- Rezek, M., Havlicek, V., und Hughes, K. R. (1978). Paradoxical stimulation of food intake by larger loads of glucose, fructose and mannose: Evidence for a positive feedback effect. *Physiol. Behav.* 21, 243–249.
- Richardson, A. R., Libby, S. J., und Fang, F. C. (2008). A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* 319, 1672–1676.
- Riedel, T., Wetzel, D., Hofmann, J. D., Plorin, S. P. E. O., Dannheim, H., Berges, M., et al. (2017). High metabolic versatility of different toxigenic and non-toxigenic *Clostridioides difficile* isolates. *Int. J. Med. Microbiol.: IJMM* 307, 311–320.
- Rochfort, S. (2005). Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J. Nat. Prod.* 68, 1813–1820.
- Rodriguez-Palacios, A., und Lejeune, J. T. (2011). Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3085–3091.
- Rosenplenter, K., Nöhle, U., und Rymon Lipinski, G.-W. v. (2007). Handbuch Süßungsmittel: Eigenschaften und Anwendung. Hamburg: Behr.
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374–378.
- Saier, M. H. (1977). Bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships. *Bacteriol. Rev.* 41, 856–871.
- Saier, M. H., und Reddy, B. L. (2015). Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: multifunctional xenologues with potential biotechnological and biomedical applications. *J. Bacteriol.* 197, 7–17.

- Saujet, L., Monot, M., Dupuy, B., Soutourina, O., und Martin-Verstraete, I. (2011). The key sigma factor of transition phase, SigH, controls sporulation, metabolism, and virulence factor expression in *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 193, 3186–3196.
- Scherf, U., und Buckel, W. (1993). Purification and properties of an iron-sulfur and FAD-containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta 3-delta 2-isomerase from *Clostridium aminobutyricum*. *Eur. J. Biochem.* 215, 421–429.
- Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., et al. (1993). Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: A putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Mol. Gen. Genet.: MGG* 241, 602–615.
- Schormüller, J. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Schreiber, W., und Dürre, P. (1999). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum*: isolation and purification of the enzyme, and sequencing and localization of the gap gene within a cluster of other glycolytic genes. *Microbiol.* 145 (Pt 8), 1839–1847.
- Schweiger, G., und Buckel, W. (1984). On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Lett.* 171, 79–84.
- Sebaihia, M., Wren, B. W., Mullany, P., Fairweather, N. F., Minton, N., Stabler, R., et al. (2006). The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat. Nat. Genet.* 38, 779–786.
- Selmer, T., Willanzheimer, A., und Hetzel, M. (2002). Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum*. Cloning of gene and identification of glutamate 324 at the active site. *Eur. J. Biochem.* 269, 372–380.
- Seto, B., und Stadtman, T. C. (1976). Purification and properties of proline reductase from *Clostridium sticklandii*. *J. Biol. Chem.* 251, 2435–2439.
- Shah, P., und Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 68, 4–16.
- Shapiro, S. S., und Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591.
- Siegenthaler, W., und Altmeyer, B., eds (2001). Klinische Pathophysiologie. Stuttgart: Thieme.
- Simpson, S. J., Vink, R., Egan, A. F., und Rogers, P. J. (1983). Lactate efflux stimulates [32 P_i]ATP exchange in *Streptococcus faecalis* membrane vesicles. *FEMS Microbiol. Lett.* 19, 111–114.
- Sliwkowski, M. X., und Hartmanis, M. G. (1984). Simultaneous single-step purification of thiolase and NADP-dependent 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Anal. Biochem.* 141, 344–347.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., und Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787.
- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H., und Kuijper, E. J. (2016). *Clostridium difficile* infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2, 16020.

- Sneath, P. H. A., McGowan, V., und Skerman, V. B. D. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 30, 225–420.
- Sorg, J. A., und Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J. Bacteriol.* 190, 2505–2512.
- Spigaglia, P., und Mastrantonio, P. (2002). Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3470–3475.
- Spura, J., Reimer, L. C., Wieloch, P., Schreiber, K., Buchinger, S., und Schomburg, D. (2009). A method for enzyme quenching in microbial metabolome analysis successfully applied to gram-positive and gram-negative bacteria and yeast. *Anal. Biochem.* 394, 192–201.
- Stabler, R. A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., et al. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol.* 10, R102.
- Stan, H.-J., und Linkerhägner, M. (1996). Large-volume injection in residue analysis with capillary gas chromatography using a conventional autosampler and injection by programmed-temperature vaporization with solvent venting. *J. Chrom. A* 727, 275–289.
- Stausberg, J. (2015). Epidemiology of *Clostridium difficile* infection. *Dtsch. Arztebl. Int.* 112, 345.
- Steigmiller, S., Turina, P., und Gräber, P. (2008). The thermodynamic H^+ /ATP ratios of the H^+ -ATPsynthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3745–3750.
- Steinegger, E., und Hänsel, R. (1988). Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer.
- Stickland, L. H. (1934). Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. *Biochem. J.* 28, 1746–1759.
- Strehmel, N., Hummel, J., Erban, A., Strassburg, K., und Kopka, J. (2008). Retention index thresholds for compound matching in GC-MS metabolite profiling. *J. Chrom. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 871, 182–190.
- Tachibana, C. (2015). Transcriptomics today: Microarrays, RNA-seq, and more. *Science* 349, 544–546.
- Tan, K. S., Wee, B. Y., und Song, K. P. (2001a). Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.* 50, 613–619.
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., und Siuzdak, G. (2012). XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal. Chem.* 84, 5035–5039.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., and Rowland, I. (2013). Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? *Anaerobe* 24, 60–65.
- Theriot, C. M., Koenigsknecht, M. J., Carlson, P. E., Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., et al. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat. Commun.* 5, 3114.

- Tiwari, S., Jamal, S. B., Hassan, S. S., Carvalho, Paulo V S D, Almeida, S., Barh, D., et al. (2017). Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: An overview. *Front. Microbiol.* 8, 1878.
- Tremblay, P.-L., Zhang, T., Dar, S. A., Leang, C., und Lovley, D. R. (2012). The Rnf complex of *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase essential for autotrophic growth. *mBio* 4, e00406-12.
- Troxell, B., und Hassan, H. M. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3.
- Turner, B. L., und Thompson, A. L. (2013). Beyond the paleolithic prescription: incorporating diversity and flexibility in the study of human diet evolution. *Nutr. Rev.* 71, 501–510.
- Turner, D. C., und Stadtman, T. C. (1973). Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 366–381.
- Vaccari, G., y González-Vara, A. R., Campi, A. L., Dosi, E., Brigidi, P., und Matteuzzi, D. (1993). Fermentative production of l-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 23–27.
- Valentine, R. C., und Wolfe, R. S. (1960). Purification and role of phosphotransbutyrylase. *J. Biol. Chem.* 235, 1948–1952.
- Vasileva, D., Janssen, H., Honicke, D., Ehrenreich, A., und Bahl, H. (2012). Effect of iron limitation and fur gene inactivation on the transcriptional profile of the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiol.* 158, 1918–1929.
- Villas-Bôas, S. G., Højer-Pedersen, J., Akesson, M., Smedsgaard, J., und Nielsen, J. (2005). Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast* 22, 1155–1169.
- Wang, Z., Gerstein, M., und Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., et al. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet* 366, 1079–1084.
- Weghoff, M. C., Bertsch, J., und Muller, V. (2015). A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environ. Microbiol.* 17, 670–677.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., und Papoutsakis, E. T. (1988). Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2717–2722.
- Wiesenborn, D. P., Rudolph, F. B., und Papoutsakis, E. T. (1989). Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 317–322.
- Wilcox, M. H., und Fawley, W. N. (2000). Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. *The Lancet* 356, 1324.
- Wolff, D. G., und Bidlack, W. R. (1976). The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 850–857.
- Wüst, J., Sullivan, N. M., Hardegger, U., und Wilkins, T. D. (1982). Investigation of an outbreak of antibiotic-associated colitis by various typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 1096–1101.

- Wydau-Dematteis, S., El Meouche, I., Courtin, P., Hamiot, A., Lai-Kuen, R., Saubaméa, B., et al. (2018). Cwp19 is a novel lytic transglycosylase involved in stationary-phase autolysis resulting in toxin release in *Clostridium difficile*. *mBio* 9.
- Yamakawa, K., Karasawa, T., Ikoma, S., und Nakamura, S. (1996). Enhancement of *Clostridium difficile* toxin production in biotin-limited conditions. *J. Med. Microbiol.* 44, 111–114.
- Young, R., und Bläsi, U. (1995). Holins: Form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 191–205.
- Yutin, N., und Galperin, M. Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ. Microbiol.* 15, 2631–2641.
- Zhang, L., Nie, X., Ravcheev, D. A., Rodionov, D. A., Sheng, J., Gu, Y., et al. (2014). Redox-responsive repressor Rex modulates alcohol production and oxidative stress tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 196, 3949–3963.
- Zhang, Z., und Pawliszyn, J. (2002). Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 65, 1843–1852.
- Zhu, Y., Guo, Y., Ye, M., und James, F. S. (2005). Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *J. Chrom. A* 1085, 143–146.
- Zughaier, S. M., und Cornelis, P. (2018). Editorial: Role of iron in bacterial pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 203.

6. Anhang

6.1. Übersicht digitaler Anhänge

Anhang	Beschreibung
A1	Extrazelluläre Konzentration an Toxin A in Kultivierungen von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm in Caseinhydrolysat-Medium mit verschiedenen Substraten.
A2	Normalisierte Peakflächen der extrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in Caseinhydrolysatmedium ohne Glucose und mit 2 g/L und 10 g/L Glucose.
A3	Anhang A3: Normalisierte Peakflächen der intrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in Caseinhydrolysatmedium ohne Glucose und mit 2 g/L und 10 g/L Glucose.
A4	Aminosäurekonzentration im zellfreien Überstand der Kultivierungen in Caseinhydrolysatmedium ohne Glucose und mit 2 g/L und 10 g/L Glucose.
A5	Ausgewählte Daten der Transkriptomanalyse mittels Microarrays von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm kultiviert mit 2 g/L Glucose.
A6	NAD ⁺ und NADH-Konzentrationen in Zellen von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm kultiviert in Caseinhydrolysat-Medium (Ref) und supplementiert mit 0,5 g/L L-Lactat (Lac) oder 2 g/L Glucose (Glc). Die Konzentrationen an NAD ⁺ und NADH wurden mittels Enzymassays bestimmt.
A7	Normalisierte Peakflächen der intrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in Caseinhydrolysatmedium (Referenz) und supplementiert mit 0,5 g/L Lactat.
A8	Normalisierte Peakflächen der extrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in Caseinhydrolysatmedium (Referenz) und supplementiert mit 0,5 g/L Lactat.
A9	Ausgewählte Daten der Transkriptomanalyse mittels Microarrays von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm kultiviert mit 0,5 g/L L-Lactat.
A10	Relative Werte der extrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in Caseinhydrolysatmedium mit 2 g/L Mannose.
A11	Wachstumskurve und Probenahmezeitpunkte von <i>C. difficile</i> 630 Δ erm kultiviert in CDMM.

Anhang	Beschreibung
A12	Normalisierte Peakflächen der intrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> in CDMM über die Wachstumskurve.
A13	Normalisierte Peakflächen der extrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> in CDMM über die Wachstumskurve.
A14	Aminosäurekonzentration im zellfreien Überstand der Kultivierungen in CDMM über die Wachstumskurve.
A15	Daten der Transkriptomanalyse mittels Microarrays von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> kultiviert in CDMM.
A16	Daten der Proteomanalyse der cytosolischen Fraktion von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> kultiviert in CDMM.
A17	Relative Aminosäurekonzentration im zellfreien Überstand der Kultivierungen in CDMM, ohne Cystein und mit 2 g/L Cystein über die Wachstumskurve.
A18	Normalisierte Peakflächen der extrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> in CDMM ohne Cystein über die Wachstumskurve.
A19	Normalisierte Peakflächen der extrazellulär detektierten Metabolite von Kultivierungen in von <i>C. difficile</i> 630 Δ <i>erm</i> in CDMM mit 2 g/L Cystein über die Wachstumskurve.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Mentor Prof. Dietmar Schomburg bedanken, für die Möglichkeit dieses Thema bearbeiten zu können und für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dieter Jahn für die Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Michael Hust für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein großer Dank gilt auch allen meinen Kooperationspartnern aus den Arbeitsgruppen des CDiff-Konsortiums, vor allem danke ich Dr. Mareike Berges und Annika-Marisa Michel aus der AG Jahn und Dr. Thomas Riedel aus der AG Overmann für die tolle Zusammenarbeit.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Meina Neumann-Schaal bedanken, für die gute Zusammenarbeit im CDiff-Projekt und die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Außerdem danke ich Sabine Kaltenhäuser und Sabine Noppenberger, ohne euch wäre der Laboralltag manchmal ganz schön schwierig. Ein großer Dank geht auch an meine Kolleginnen Dr. Sarah Kirstein und Dr. Sabine Will, für das Gegenlesen meiner Arbeit, die gemeinsame lustige Zeit und die Hilfestellung, auch in Kriesensituationen. Auch möchte ich Nelli Bill für die seelische Unterstützung in den letzten Monaten danken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Atmosphäre, die netten Gespäche und fachlichen Diskussionen danken. Mit euch hatte man auch in stressigen Zeiten immer viel Spaß.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und Freunden, für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen. Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei Sven bedanken, für den Rückhalt und die Geduld und die stets aufmunternden Worte.

